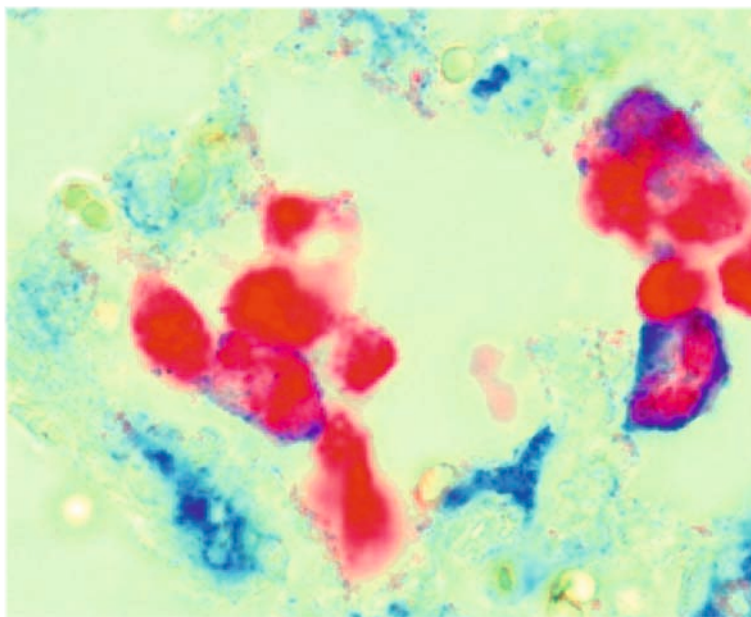


Herkunft und Proliferation von Alveolarmakrophagen nach experimenteller Lungentransplantation in der Ratte

Jochen Markus Sucke



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2012

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2012

© 2012 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Herkunft und Proliferation von Alveolarmakrophagen nach
experimenteller Lungentransplantation in der Ratte**

**Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktor der Medizin
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von

**Jochen Markus Sucke
aus Frankfurt**

Gießen 2011

**Klinik für Allgemein-, Viszeral-, Thorax-,
Transplantations- und Kinderchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Winfried Padberg
Sektion Experimentelle Chirurgie
Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen**

**Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau
Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ralph Schermuly
Tag der Disputation: 02.07.2012**

Meiner Frau Nicola und meinen Kindern

Lisa-Marie und Vincent Linus gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lungentransplantation	1
1.1.1	Aktueller Stand der klinischen Lungentransplantation	1
1.2	Pathologie des Lungentransplantats	2
1.2.1	Primäres Organversagen	2
1.2.2	Infektion und Sepsis	3
1.2.3	Akute Abstoßung	4
1.2.4	Chronische Abstoßung / Bronchiolitis obliterans Syndrom	5
1.3	Makrophagen	8
1.3.1	Alveolarmakrophagen	8
1.3.2	Lokalisation und Morphologie der Alveolarmakrophagen	9
1.3.3	Erneuerung der Alveolarmakrophagenpopulation	9
1.3.4	Interstitielle Makrophagen	10
1.3.5	Alveolarmakrophagen im Lungentransplantat	10
1.4	Zielsetzung	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Verwendete Antikörper	13
2.1.2	Testsubstanzen und Medikamente	15
2.1.3	Puffer und Lösungen	17
2.1.4	Statistische Auswertung und Diagramme	19
2.2	Methoden	20
2.2.1	Versuchstiere	20
2.2.2	Transplantation der Rattenlungen	20
2.2.3	Organexplantation und Fixierung	21
2.3	Immunhistochemie	22
2.3.1	Immunhistochemische Doppelfärbungen mit den Antikörpern OX6 bzw. OX76 und ED1	22
2.3.2	ISH und Färbung mit dem Antikörper ED1	23
2.3.3	Immunhistochemische Doppelfärbung mit den Antikörpern ED1 bzw. ED2 und Bu20a	25
2.4	Auswertung	27
2.4.1	Makrophagenherkunft (immunhistochemische Doppelfärbungen)	27
2.4.2	Makrophagenherkunft (In-situ-Hybridisierung)	27
2.4.3	DNA-Synthese in Makrophagen	28

3	Ergebnisse	29
3.1	Herkunft der Alveolarmakrophagen	29
3.1.1	MHC Klasse II-positive Alveolarmakrophagen	29
3.1.2	Alveolarmakrophagen mit Spendertyp-MHC Klasse II	30
3.1.3	Alveolarmakrophagen mit Spenderkaryotyp	33
3.2	Proliferation von Makrophagen der Lunge	36
3.2.1	Alveolarmakrophagen	36
3.2.2	Interstitielle Makrophagen	39
4	Diskussion	42
4.1	Herkunft der Alveolarmakrophagen	42
4.2	Proliferation von Alveolarmakrophagen und interstitiellen Makrophagen	45
5	Zusammenfassung	49
5.1	Herkunft und Proliferation von Alveolarmakrophagen nach Lungentransplantation in der Ratte	49
5.2	Origin and proliferation of alveolar macrophages after lung transplantation in the rat	51
6	Liste der Abkürzungen	53
7	Literaturverzeichnis	55
8	Publikationen	66
9	Eidesstattliche Erklärung	67
10	Danksagung	68
11	Lebenslauf	69

1 Einleitung

1.1 Lungentransplantation

1.1.1 Aktueller Stand der klinischen Lungentransplantation

Die Lungentransplantation gilt als etabliertes Verfahren zur chirurgischen Therapie von Lungenerkrankungen im Endstadium^{36,40,59}. Im Jahr 2005 wurden weltweit erstmalig über 2000 Lungen transplantiert¹²⁹. Grundvoraussetzung für die Indikationsstellung zur Lungentransplantation ist die Progredienz der ursächlichen Erkrankung trotz optimierter konservativer Therapie. Das Spektrum der zur Transplantationsindikation führenden Erkrankungen beinhaltet neben häufigen Erkrankungen wie der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) auch andere Formen des Lungenemphysems wie den α -1-Antitrypsinmangel. Hinzu kommen die idiopathische pulmonale Fibrose, die Mukoviszidose und die primäre pulmonale Hypertonie. Seltene Indikationen sind die Sarkoidose und die Lymphangioliomyomatose. Bei den kombinierten Herz-Lungen-Transplantationen sind die häufigsten Indikationen schwere kongenitale Vitien mit Eisenmenger-Reaktion und die primäre pulmonale Hypertonie^{36,129}.

Die klinischen Ergebnisse nach Lungentransplantationen sind verglichen mit den Transplantationen anderer solider Organe aktuell nicht zufriedenstellend. Zwar ist es gelungen, das Fünf-Jahres-Transplantatüberleben mittels optimierter Immunsuppression weiter anzuheben, es liegt jedoch derzeit mit 45-63%^{16,0,61,129} noch deutlich unter dem von Nierentransplantaten mit 83-85%^{19,120}. Verschärft wird diese Situation noch durch die Tatsache, dass einem niereninsuffizienten Patienten im Falle eines Transplantatversagens zumeist ein Überleben mittels Hämodialyse möglich ist. Dem Lungentransplantierten ist es jedoch in der Regel nicht möglich, ein Transplantatversagen mittelfristig zu überleben, sofern nicht umgehend ein anderes Organ für ihn gefunden wird. Die Mortalität nach Lungentransplantation wird in den ersten 30 Tagen nach Transplantation durch primäres Organversagen, Infektionen und Sepsis, sowie im Laufe des ersten Jahres durch die akute Abstoßung und ebenfalls Infektionen bestimmt. Nach einem Jahr tritt neben den Infektionen das Bronchiolitis obliterans Syndrom (BOS) in den Vordergrund^{16,0,61,129,144}. Fünf Jahre nach Transplantation haben 45% der Patienten ein BOS entwickelt¹²⁹.

1.2 Pathologie des Lungentransplantats

1.2.1 Primäres Organversagen

Die perioperative Sterblichkeit nach Lungentransplantation liegt mit ca. 20% im Vergleich zur Transplantation anderer solider Organe wie Herz, Leber oder Niere deutlich höher. Ursächlich liegt hier neben Infektionen und chirurgisch technischen Komplikationen vorrangig ein primäres Organversagen auf dem Boden eines Ischämie-Reperfusionsschadens vor¹²⁹. Nach Lungentransplantation tritt in 40% der Fälle ein Reperfusionsschaden mit Dysfunktion der transplantierten Lunge auf⁷⁷. 10-20% der Lungentransplantierten entwickeln eine schwere respiratorische Insuffizienz und ein ausgeprägtes pulmonales Ödem, die eine verlängerte Beatmungsdauer mit hohen Beatmungsdrücken und hoher Sauerstoffkonzentration nötig machen^{21,76,123}.

Das klinische Bild ähnelt dem eines *acute respiratory distress syndrome* (ARDS). Unter Mitwirkung von polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten und deren Mediatoren wird die Blut-Luftschranke durchlässig für Flüssigkeit und Proteine. Die entstandenen Lücken zwischen vaskulärem, interstitiellem und alveolärem Kompartiment sind so groß, dass neben Plasmaproteinen und Fibrin(ogen) selbst IgM-Moleküle in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) nachgewiesen werden können. Durch das Ausströmen von Plasmaproteinen in das alveoläre Kompartiment wird die Surfactantfunktion inhibiert, was wiederum die Ausbildung von Atelektasen, eine erniedrigte pulmonale Compliance und einen erhöhten funktionellen rechts-links-Shunt begünstigt^{43,71,76,123}. Die Mortalität des frühen Transplantatversagens wird mit ca. 25% angegeben.

Die bisherige Behandlung dieser Komplikation entspricht der eines ARDS. Zudem gibt es Hinweise, dass bei Patienten die postoperativ einen schweren Reperfusionsschaden durchgemacht haben, gehäuft ein BOS auftritt³⁸. Nach Ausschluss chirurgischer Komplikationen sind der Ischämie-Reperfusionsschaden, vorbestehende Probleme der Spenderlunge und Infektionen die Hauptursachen für das primäre Transplantatversagen²⁹.

1.2.2 Infektion und Sepsis

Wie bereits in Kap. 1.1.1 beschrieben, haben pulmonale Infekte zu allen Zeiten des postoperativen Verlaufes große Auswirkungen auf die Morbidität und Mortalität des Lungentransplantierten. Diese zeigen unter den Organtransplantierten die höchste Inzidenz für pulmonale Infekte^{22,81,83,95}. Das hierfür verantwortliche Erregerspektrum ändert sich in charakteristischer Weise im Zeitverlauf³⁹.

In den ersten 30 Tagen nach Transplantation wird das Infektionsrisiko durch die Operation und intensivmedizinische Behandlung sowie den Beginn der immunsuppressiven Therapie bestimmt und wird mit einer Inzidenz von ca. 35% angegeben³⁹. Hier kommen vorwiegend nosokomiale, gramnegative Bakterien und Staphylokokken zum Tragen. Zudem sind die Lungentransplantatempfänger nicht nur den Keimen der Umgebung, sondern auch einer Keimübertragung aus dem Spenderorgan und einem erneuten Aufflammen chronischer Infektionen aufgrund der zum Lungenversagen führenden Grunderkrankung ausgesetzt^{20,39,141}. Schließlich verschärft die reduzierte mukoziliäre Clearance und die reduzierte Durchblutung im Anastomosenbereich das Infektrisiko^{64,122}.

Die Zeit vom ersten bis zum sechsten Monat nach Transplantation wird durch die hochdosierte Immunsuppression bestimmt, um das Risiko einer akuten Abstoßung zu minimieren. Da die Patienten in dieser Zeit in der Regel bereits in ihre häusliche Umgebung entlassen sind, stellen nun weniger die nosokomialen Erreger sondern vielmehr opportunistische Infektionen eine Bedrohung dar³⁹. Die bedeutendsten sind das Zytomegalievirus (CMV) und der Aspergillus^{17,85,121,147}.

Nach einem halben Jahr wird die Immunsuppression in der Regel reduziert, worauf die opportunistischen Infektionen etwas in den Hintergrund treten. Häufiger sind in dieser Zeit Bronchopneumonien aufgrund herkömmlicher viraler und bakterieller Infekte^{39,83}. Neben der Bedrohung des Patienten durch den Verlauf der bronchialen und pneumonischen Infekte selbst sind diese jedoch vor allem als Risikofaktor für die akute Abstoßung sowie eine später einsetzende chronische Abstoßung von Bedeutung^{45,53}.

1.2.3 Akute Abstoßung

Während des ersten Jahres erleiden zwischen 50 und 85% der Lungentransplantierten mindestens einmal eine bioptisch nachgewiesene akute Abstoßung (Schweregrad A2 oder höher, siehe Tab. 1)^{31,98,105,129}. Das klinische Bild ist ausgesprochen heterogen. Es reicht von völliger Symptomfreiheit über produktiven Husten, Fieber, Dyspnoe, Hypoxie bis hin zum ARDS³⁰. Weder diese Symptome noch die Ergebnisse einer bronchoalveolären Lavage (BAL) im Rahmen der Bronchoskopie zeigen eine ausreichende Sensitivität oder Spezifität in der Unterscheidung der akuten Abstoßung von Infektionen¹⁰⁹. Da nun bei der Lungenfunktionsprüfung^{5,135} und der Bildgebung (native Röntgenaufnahme des Thorax, Computertomographie)⁵⁴ bezüglich der akuten Abstoßung ebenfalls keine große Sensitivität vorliegt, kommt bei der Sicherung der Diagnose der transbronchialen Biopsie eine entscheidende Bedeutung zu⁸⁶. Histologisch lassen sich zwei Formen mit jeweils fünf unterschiedlichen Schweregraden bei den akuten, zellulären Abstoßungsreaktionen erkennen. Zum einen findet sich die vaskuläre Abstoßung mit je nach Schweregrad mehr oder minder stark ausgeprägten perivaskulären Infiltraten, im Verlauf einer Schädigung des Gefäßendothels und intraalveolärer Zellvermehrung. Zum anderen zeigt sich die bronchiale Abstoßung in Form der lymphozytären Bronchitis und Bronchiolitis mit mononukleären Infiltraten des respiratorischen Epithels bis hin zu Nekrosen und fibrinopurulenten Exsudaten^{129,146}.

Tab. 1 Histologische Einteilung der Abstoßung des Lungentransplantats

akute, vaskuläre Abstoßung ISHLT A	perivaskuläre entzündliche Infiltrate	Endothelitis, eosinophile Granulozyten	entzündliche Infiltrate in Septen, Alveolar-makrophagen ↑	diff. Alveolarwand-schaden, Nekrosen, intraalveoläre Hämorrhagie
A0 keine	-	-	-	-
A1 minimale	+	-	-	-
A2 leichte	++	+	-	-
A3 mäßige	+++	++	+	-
A4 schwere	++++	+++	++	+
akute, bronchiale Abstoßung (lymphozytäre Bronchitis/ Bronchiolitis) ISHLT B	mononukleäre Infiltrate in der Schleimhaut	intraepitheliale Lymphozyten	Nekrosen, fibrinopurulentes Exsudat	
B0 keine	-	-	-	
B1 minimale	+	-	-	
B2 leichte	++	+	-	
B3 mäßige	+++	++	+	
B4 schwere	++++	+++	++	
chronische Abstoßung / Bronchiolitis obliterans ISHLT C				
Ca (aktiv)	submuköse und/oder intraluminale Fibrose mit Infiltraten mononukleärer Zellen			
Cb (inaktiv)	Lumen durch Narbengewebe verschlossen, ohne wesentliche Entzündungszeichen			
chronische, vaskuläre Abstoßung ISHLT C				
	fibrointimale Verdickung von Arterien und Venen, eventuell mit mononukleären, entzündlichen Infiltraten			

Trulock et al. (2007)¹²⁹, Yousem et al. (1996)¹⁴⁶

Je geringer die Histokompatibilität zwischen Spender und Empfänger ausgeprägt ist, umso größer ist das Risiko, eine akute Abstoßungsreaktion zu erleiden^{48,73,107}. Weitere Risikofaktoren sind bronchopulmonale Infekte^{87,139} und die gastroösophageale Refluxkrankheit⁶².

1.2.4 Chronische Abstoßung / Bronchiolitis obliterans Syndrom

Die Bronchiolitis obliterans wurde lange Zeit als die histopathologische Manifestation der chronischen Abstoßung^{34,137} angesehen. Sie wurde erstmalig 1984 bei Patienten nach Herz/Lungen-Transplantation beschrieben, bei denen es im Verlauf zu einer fortschreitenden Reduktion des forcierten expiratorischen Volumens (FEV₁) kam. Transbronchiale Biopsien zeigten bei diesen Patienten intraluminal polypoides, fibromyxoides Granulationsgewebe und Plaques von submukösen, eosinophilen, kollagenen Narben mit der Tendenz zur Lumenobstruktion¹⁴. Nachfolgende Studien

zeigten, dass es durch transbronchiale Biopsien häufig nicht möglich ist, adäquate Gewebeproben zu gewinnen, um diese Läsionen nachzuweisen^{94,138}. Daher etablierte die *International Society for Heart and Lung Transplantation* (ISHLT) den Begriff des BOS basierend auf einer klinischen Klassifikation, um anhand von Lungenfunktionsparametern Patienten mit einer chronischen Transplantatschädigung zu detektieren³⁵.

Tab. 2 Klassifikation des Bronchiolitis obliterans Syndrom

BOS 0	FEV ₁ > 90% des postoperativen Ausgangswertes und MEF ₂₅₋₇₅ > 75% des postoperativen Ausgangswertes
BOS 0p	FEV ₁ 81 - 90% des postoperativen Ausgangswertes und/oder MEF ₂₅₋₇₅ ≤ 75% des postoperativen Ausgangswertes
BOS 1	FEV ₁ 66 - 80% des postoperativen Ausgangswertes
BOS 2	FEV ₁ 51 - 65% des postoperativen Ausgangswertes
BOS 3	FEV ₁ ≤ 50% des postoperativen Ausgangswertes

Estenne et al. (2002)³⁵

Eine systematische Untersuchung an den explantierten Lungen von Patienten, die sich aufgrund eines schweren BOS einer Retransplantation unterziehen mussten, aus dem Jahr 2006 zeigte, dass gerade einmal bei der Hälfte der Patienten das histopathologische Bild einer schweren Bronchiolitis obliterans nachweisbar war⁹³. Daneben fanden sich Cholesterinablagerungen, interstitielle Fibrose und Gefäßveränderungen⁹³. In weiteren Arbeiten fand sich bei dem Großteil der Patienten mit BOS eine schwere pulmonale Hypertonie^{103,114}. Die histologisch nachweisbaren Gefäßveränderungen, die mit dem BOS einher gehen, waren vorwiegend Intimahyperplasien, sowie Ablagerungen und Muskelatrophie in der Media¹¹⁴.

Das BOS scheint in seinem Auftreten unabhängig von der Art der Transplantation (SLT/DLT/HLT), und der zur Transplantation führenden Grunderkrankung⁷⁹. Zum Auftreten des BOS kommt es in Mittel nach drei bis vier Jahren nach Transplantation mit jedoch einer enormen Varianz von null bis 9,4 Jahren^{15,34,88}. Die Inzidenz für das BOS liegt im ersten Jahr bei etwa 10%, nach drei Jahren bei etwa 30% und nach fünf Jahren

bei zirka 45%. Es ist die bedeutendste Langzeitkomplikation und die Haupttodesursache im Spätintervall¹³⁰. Es konnte gezeigt werden, dass Phasen der akuten Abstoßung, unabhängig von deren Schwere, ein erheblicher Risikofaktor für die Entstehung eines BOS sind^{60,63,68,74,111}. Auch die Histokompatibilität ist für die Entwicklung eines BOS von Bedeutung. Mit dem Auftreten von Anti-HLA-Klasse I- und II-Antikörpern steigt das Risiko für ein BOS an^{47,106}.

Der Zusammenhang zwischen pulmonalen CMV-Infektionen und der Entstehung eines BOS wird kontrovers diskutiert. Während einige Studien diesen Zusammenhang belegen^{63,84}, wird er in anderen nur als marginal^{46,132}, in wieder anderen als nicht relevant eingestuft^{2,69}. Diese diskordanten Ergebnisse beruhen wahrscheinlich auf den verschiedenen Strategien zur Behandlung und Prävention einer CMV-Infektion. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit Ganciclovir und Anti-CMV-Immunglobulinen das Risiko einer CMV-Infektion und der Entstehung eines BOS deutlich zu senken vermag^{113,126}. Die Bedeutung herkömmlicher, vorwiegend viral bedingter, bronchopulmonaler Infekte^{75,87,139}, von Herpesvirus Typ 6-Infektionen¹⁰⁴ sowie von Chlamydien-^{49,82} und Pseudomonaden-Infektionen^{11,140} ist für das Auftreten sowohl akuter Abstoßungsepisoden, als auch für das BOS unbestritten. Auch wurde nachgewiesen, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Schwere eines primären Organversagens und dem Risiko eines BOS besteht²⁷.

Schließlich gilt auch das Vorhandensein einer gastroösophagealen Refluxkrankheit und die daraus häufig resultierenden schleichenden Aspirationen als prognostisch ungünstig im Hinblick auf das BOS^{9,18,26,62}.

1.3 Makrophagen

Die Makrophagen sind Zellen der angeborenen Immunabwehr. Sie sind mesodermaler Herkunft und entstammen dem Knochenmark¹¹⁷. Aus den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks gehen die Zellen der myeloischen Stammzellreihe hervor. Daraus entwickeln sich zunächst Monoblasten und später Monozyten¹¹⁷. Die gereiften Monozyten migrieren aus dem Knochenmark ins Blut. Sie wandern in verschiedene Zielgewebe ein und differenzieren sich dabei induziert durch Wachstumsfaktoren zu Makrophagen¹¹⁷. Daher gehören sie meist zu den ersten Zellen, die eingedrungene Krankheitserreger erkennen. Sie nehmen diese in Phagosomen auf, wo die Erreger nach Fusion mit Lysosomen abgetötet und verdaut werden. Darüber hinaus prozessieren sie Antigene zu Peptiden und präsentieren sie den T-Lymphozyten im Komplex mit spezialisierten Oberflächenmolekülen (MHC-Moleküle)¹¹⁷. Großen Einfluss auf die Funktion der Makrophagen haben die T-Helferzellen. Über die T₁-Helferzellen werden proinflammatorische Eigenschaften der Makrophagen aktiviert. Sie produzieren dann Sauerstoffradikale und Stickstoffmonoxid. Die Sauerstoffradikale können zur Schädigung des Alveolar- und Bronchialepithels beitragen^{1,10}. Eine gefäßendothelschädigende Wirkung wird lokal hohen Stickstoffmonoxidkonzentrationen zugeschrieben^{8,58}. Zudem können Monozyten und Makrophagen proinflammatorische und chemotaktische Zytokine freisetzen^{0,91,101}. Die über die T₂-Helferzellen aktivierten Makrophagen haben eher eine antiinflammatorische, immunregulierende und angiogenetische Wirkung^{51,55, 92,124}.

Gewebsmakrophagen der Lunge sind die Alveolarmakrophagen und die interstitiellen Makrophagen.

1.3.1 Alveolarmakrophagen

Die Lunge ist einerseits permanent dem direkten Kontakt mit pathogenen und apathogenen Erregern sowie unbelebten Partikeln aus der Umgebung ausgesetzt, welche mit der inhalierten Atemluft über das Bronchialsystem in die Alveolen gelangen. Die körpereigene Abwehr muss auf diese adäquat reagieren und sie eliminieren³. Auf der anderen Seite ist die Funktion der Lunge in höchstem Maße abhängig von dünnwandigen und intakten, alveolaren Strukturen. Eine durch eine inflammatorische Antwort - sei dies ein Ödem oder fibrotischer Umbau - verlängerte Diffusionsstrecke zwischen

Alveolarraum und Kapillarlumen stellt eine schwerwiegende Beeinträchtigung des Gasaustausches dar. Daher ist eine gut regulierte Immunantwort für die Lungenfunktion essentiell. Die erste Linie dieser Immunantwort bilden die Alveolarmakrophagen. Pathogene und apathogene Partikel, welche mit der Atemluft inhaliert werden, werden durch die Alveolarmakrophagen aufgenommen und entsorgt^{3,127}. In der Antigenpräsentation spielen die Alveolarmakrophagen eine eher untergeordnete Rolle. Es scheint, als würde die erworbene Immunantwort der gesunden Lunge durch sie abgeschwächt⁶⁷.

1.3.2 Lokalisation und Morphologie der Alveolarmakrophagen

Die Alveolarmakrophagen sitzen in dem von den Pneumozyten Typ II produzierten Surfactant-Film aus Phospholipiden und Proteinen auf der Innenfläche der Alveolen⁷⁰. Sie befinden sich somit auf der der Umwelt zugewandten Körperoberfläche. Ihre absolute Anzahl in der menschlichen Lunge wird auf etwa $2,3 \times 10^{10}$ geschätzt¹⁰². Sie haben einen Durchmesser zwischen 15 bis 50 μm und ein Verhältnis von Zytoplasma zu Kern von etwa 3 zu 1^{65,66}. Ihre Lebensdauer beträgt im Mittel 81 Tage¹²⁸. In der BALF einer gesunden Lunge repräsentieren sie etwa 90% der gewonnenen Zellen¹¹⁰.

1.3.3 Erneuerung der Alveolarmakrophagenpopulation

Die Dynamik der Alveolarmakrophagenpopulation in der gesunden Lunge ist in einigen Studien beschrieben. Die Erneuerung des Zellpools beruht unter Normalbedingungen in erster Linie auf der Einwanderung und Differenzierung der Monozyten des Blutes direkt oder auf der Migration und Differenzierung interstitieller Makrophagen^{12,115,127}. Nur bei einem geringen Bruchteil der Alveolarmakrophagen lässt sich eine Proliferation in den Alveolen nachweisen^{6,41}.

Bisher wurde davon ausgegangen, dass auch die Vermehrung der Population in pathologischen Situationen in erster Linie auf einer vermehrten Differenzierung von Monozyten zu Alveolarmakrophagen während deren Migration in den Alveolarraum beruht^{90,96}. Hinzu kommen ein verlängertes Überleben dieser Zellen sowie eine verringerte *clearance* aus dem Bronchialsystem. Im Rahmen von Entzündungsreaktionen steigt die Zahl der in Proliferation befindlichen Alveolarmakrophagen nur geringfügig an^{6,41}. Einer Proliferation der Alveolarmakrophagen vor Ort als Reaktion auf

immunologische Prozesse wurde daher bislang nur eine untergeordnete Rolle zugeschrieben^{4,41}.

1.3.4 Interstitielle Makrophagen

Ebenso wie die Alveolarmakrophagen dienen die interstitiellen Makrophagen der Lunge als Zellen des angeborenen Immunsystems der Phagozytose. Im Weiteren sind auch sie zur Abgabe von Zytokinen fähig^{25,98} und stellen somit in der Lunge eine zweite Abwehrlinie dar⁹⁰. Wie bereits oben erwähnt, wird eine Proliferation und Differenzierung dieser Zellen zu Alveolarmakrophagen diskutiert^{12,90,115,127}. In der gesunden Rattenlunge ist eine Unterscheidung dieser beider Populationen mittels der monoklonalen Antikörper ED1 und ED2 möglich. Während ED1 an ein CD68-ähnliches lysosomales Membranantigen der Alveolarmakrophagen bindet, ist eine Markierung dieser Zellen mit ED2 nicht möglich. ED2 erkennt den Hämoglobin-scavenger-Rezeptor (CD163) der interstitiellen Makrophagen und bindet nicht an Alveolarmakrophagen^{32,133}.

1.3.5 Alveolarmakrophagen im Lungentransplantat

Die Alveolarmakrophagen im Lungentransplantat stammen initial erwartungsgemäß vom Spender. In der Regel erscheinen binnen der ersten zwei Wochen auch Empfänger-makrophagen in den Alveolen⁷⁸. Nach sechs bis zwölf Monaten sind die Makrophagen des Spenders weitgehend eliminiert¹⁴². In einigen Fällen sind jedoch auch nach mehreren Jahren vom Spender stammende Alveolarmakrophagen nachweisbar, es besteht ein zellulärer Chimärismus^{78,112}. Bei einer mittleren Lebensdauer der Alveolarmakrophagen von etwa 81 Tagen ist dies ein erster Hinweis auf Proliferation der Spendermakrophagen, da eine Differenzierung aus Spendermonozyten nach Transplantation nicht mehr in nennenswertem Umfang gegeben ist. Bereits 1994 zeigten Keenan et al., dass Chimärismus bei Lungentransplantationen mit einer niedrigeren Inzidenz des BOS verbunden ist⁷². Der Grad des Chimärismus korreliert mit einer verringerten Immunantwort auf Spenderantigene¹⁰⁸.

Die Bedeutsamkeit der Alveolarmakrophagen für den Reperfusionsschaden im Lungentransplantat haben experimentelle Untersuchungen belegt^{37,148}. Während der akuten Abstoßung und bei Infektionen aber auch bei der Organreperfusion werden die Alveolarmakrophagen aktiviert, ihre Zahl steigt deutlich an und sie produzieren

proinflammatorische Botenstoffe^{80,118,119,125,131,145}. Werden allogene Alveolarmakrophagen zusammen mit dendritischen Zellen in Mäuselungen eingebracht, so entstehen histopathologische Veränderungen, die mit einer akuten Abstoßung vergleichbar sind. Werden die dendritischen Zellen alleine zugeführt, bleiben diese Veränderungen aus¹⁴³. Des Weiteren sind die Alveolarmakrophagen an der Entwicklung des akuten Lungenversagens nach allogener Knochenmarktransplantation beteiligt²⁴. Ihre Beteiligung an Abstoßungsprozessen ist daher belegt, die genaue Bedeutung hierbei jedoch bislang weitgehend ungeklärt.

Es ist daher von grundlegender Bedeutung, die Abläufe zu untersuchen, welche die Anzahl der Alveolarmakrophagen bestimmen und zu einer Vermehrung der Population in pathologischen Situationen führen. Nach Induktion einer akuten *graft versus host*-Reaktion durch intravenöse Injektion allogener Lymphknoten- und Milzzellen bei Mäusen konnte eine geringe Proliferation der Alveolarmakrophagen nachgewiesen werden⁴⁴. Zum Proliferationsverhalten der Alveolarmakrophagen im Lungentransplantat sind bisher jedoch keine Studien veröffentlicht.

1.4 Zielsetzung

Diese Arbeit untersucht die Dynamik von Alveolarmakrophagen in der allogenen und isogenen Lungentransplantation in der Ratte.

Folgende Hypothesen sollen überprüft werden:

Während der akuten Abstoßung eines allogenen Lungentransplantates bei der Ratte bleiben Alveolarmakrophagen des Spenders in großer Zahl nachweisbar.

Die Zunahme des Infiltrates während der akuten Abstoßung eines allogenen Lungentransplantates bei der Ratte beruht neben der Rekrutierung und Differenzierung von Monozyten auch auf der Proliferation von Makrophagen in den Alveolen.

Die Proliferationsrate der Alveolarmakrophagen ist im allogenen Lungentransplantat der Ratte deutlich höher als im isogenen Transplantat.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete Antikörper

Monoklonaler Antikörper ED1

Verdünnung:	1:500 mit PBS/BSA/Azid
Spezifität:	CD68-ähnlich
Nummer:	MCA341R
Firma:	Serotec GmbH, Düsseldorf, Deutschland

Der monoklonale Antikörper ED1 bindet an ein CD68-ähnliches lysosomales Membranantigen und markiert in der gesunden Rattenlunge Alveolarmakrophagen, dendritische Zellen und Monozyten, nicht jedoch interstitielle Makrophagen³².

Monoklonaler Antikörper ED2

Verdünnung:	1:200 mit PBS/BSA/Azid
Spezifität:	CD163
Nummer:	MCA342R
Firma:	Serotec GmbH, Düsseldorf, Deutschland

Der monoklonale Antikörper ED2 bindet an den Hämoglobin Scavenger Rezeptor (CD163) und markiert in der gesunden Rattenlunge interstitielle Makrophagen, nicht jedoch Alveolarmakrophagen und Monozyten³².

Monoklonaler Antikörper OX6

Verdünnung:	1:800 mit PBS/BSA/Azid
Spezifität:	MHC CLASS II RT1B (monomorph)
Nummer:	MCA46R
Firma:	Serotec GmbH, Düsseldorf, Deutschland

Der monoklonale Antikörper OX6 erkennt das RT1B MHC II-Molekül und bindet daher in der Ratte an MHC Klasse II-positive Zellen⁹⁷.

Monoklonaler Antikörper OX76

Verdünnung:	1:500 mit PBS/BSA/Azid
Spezifität:	MHC CLASS II RT1Ba,c (monomorph)
Nummer:	MCA826
Firma:	Serotec GmbH, Düsseldorf, Deutschland

Der monoklonale Antikörper OX76 bindet an das RT1Ba,c MHC II-Molekül und markiert daher in der Ratte MHC Klasse II-positive Zellen des Dark Agouti-Rattenstammes¹³⁴.

Monoklonaler Antikörper Bu20a

Verdünnung:	1:1000 mit PBS/BSA/Azid
Spezifität:	5-Brom-2'-Desoxyuridin
Nummer:	M 0744
Firma:	DAKO GmbH, Hamburg, Deutschland

Der monoklonale Antikörper Bu20a bindet an 5-Brom-2'-Desoxyuridin (BrdU), welches nach vorheriger Pulsmarkierung im Rahmen der DNA-Replikation während der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in den Basenstrang eingebaut wird¹³.

Polyklonaler Antikörper Anti-Digoxigenin-AP, Fab-Fragmente

Verdünnung:	1:500 mit PBS/BSA/Azid
Spezifität:	Digoxigenin und Digoxin
Nummer:	11093274910
Firma:	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Der polyklonale Antikörper Anti-Digoxigenin-AP reagiert mit der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde zum Nachweis des Y-Chromosoms (9.IES 8, y-probe) welche im Rahmen der zuvor durchgeführten In-situ-Hybridisierung (ISH) an das Y-Chromosom bindet³³.

2.1.2 Testsubstanzen und Medikamente

3,3'-Diaminobenzidin, DAB (Sigma-Aldrich, Steinheim; D5905)

5-Brom-2'-Desoxyuridin, BrdU (Sigma-Aldrich, Steinheim; B5002)

Ampicillin ratiopharm 500 mg (ratiopharm, Ulm)

Ampuwa (Diaco, Serag-Wiessner, Naila; 2034374)

anti-mouse-Immunglobulin HRP, Peroxidase-gekoppelt, aus dem Kaninchen (Dako-Cytomation, Carpinteria, USA)

Atipamezolhydrochlorid (Janssen-Cilag, Neuss)

Atropinsulfat (B.Braun, Melsungen)

BSA, Albumin, *bovine fraction V* (Serva, Heidelberg; 11930)

Dextransulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim; D8906)

DNA-Sonde zum Nachweis des Y-Chromosoms (Fr. Prof. B. Hoebee, RIVM, Amsterdam)

Dimethylformamid, C₃H₇NO (Merck, Darmstadt; 1.03053)

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Na₂HPO₄·2H₂O (Merck, Darmstadt; 1.06580.1000)

EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)-Disodium (Serva, Heidelberg; 11280)

EnVision+®System labelled polymer-alkaline phosphatase(AP) anti-rabbit/mouse

(DakoCytomation, Carpinteria, USA, K4018)

Ethanol (Sigma-Aldrich, Seelze; 25690)

Fast Blue BB Salt (Sigma-Aldrich, Steinheim; F-3378)

Fast Red (Sigma-Aldrich, Steinheim; F-1630)

Formamid deionisiert, CH₃NO (Sigma-Aldrich, Steinheim; F9037)

Glycergel Mounting Medium (DakoCytomation, Carpinteria, USA; C0563)

Heparin ratiopharm 25 000 IE/5 ml (ratiopharm, Ulm)

Isofluran (Baxter, Unterschleißheim; 7311944)

Isopropanol (Baker, Griesheim; 8067)

Kaliumchlorid, KCl (Merck, Darmstadt; 4936)

Kaliumdihydrogenphosphat, KH₂PO₄ (Merck, Darmstadt; 1.04873.0250)

Ketaminhydrochlorid (bela-pharm, Vechta)

Levamisol, C₁₁H₁₂N₂S (Sigma-Aldrich, Steinheim; L9756)

Magnesiumchlorid, MgCl₂ (Sigma-Aldrich, Steinheim; M0250)

Medetomidinhydrochlorid (Janssen-Cilag, Neuss)

Naphthol AS-MX-Phosphat (Sigma-Aldrich, Steinheim; N4875)

Natriumazid, NaN₃ (Merck, Darmstadt; 1.06688.0100)

Natriumchlorid, NaCl (Roth, Karlsruhe; 3957.1)

Natriumdihydrogensulfat-Dihydrat, NaH₂PO₄·2H₂O (Merck, Darmstadt; 1.06345.1000)

Natriumhydrogensulfat-Dihydrat, Na₂HPO₄·2H₂O (Merck, Darmstadt; 1.06580.1000)

Natriumhydroxid, NaOH (Merck, Darmstadt; 1.09137.1000)

Nitroblau-Tetrazoliumchlorid/Bromchlorindoxylphosphat, NBT-BCIP (Sigma-Aldrich, Steinheim; 72091)

Normalrattenserum (Harlan-Winkelmann, Borcheln)

Paraffin (Vogel, Gießen)

Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, Steinheim; P6148)

Pepsin (Sigma-Aldrich, Steinheim; P7012)

Protease Typ XIV (Sigma-Aldrich, Steinheim; P5147)
 RNase A (Sigma-Aldrich, Steinheim; R5503)
salmon testes DNA (Sigma-Aldrich, Steinheim; D1626)
 Salzsäure, HCl (Merck, Darmstadt; 1.09057.1000)
 Silan, 3-Aminopropyltriethoxysilan 98% (Sigma-Aldrich, Steinheim)
 Trinatriumcitrat-Dihydrat, $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ p.a. (Merck, Darmstadt; 1.06448.0500)
 Tris Base 99,9% (Sigma-Chemical, St.Louis, USA; T-1503-1)
 Tween 20 (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn; 8.22184.0500)
 UHU-Alleskleber (Uhu, Bühl)
 Wasserstoffperoxid, H_2O_2 (30%) (Merck, Darmstadt; 1.07209.1000)
 Xylol (Merck, Darmstadt; 1.08685.2500)
 Zitronensäure-Monohydrat, $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ (Merck, Darmstadt; 1.0024.0500)

2.1.3 Puffer und Lösungen

Lösung/Puffer	Herstellung
0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2	▪ 3,08 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ und 14,3 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ in 500 ml VE-Wasser lösen
0,1% Tween/SSC _(4x)	▪ 200 µl Tween 20 mit 200 ml SSC _(4x) mischen
alkalischer Substratpuffer	▪ 1,68 g Tris Base, 0,731 g NaCl und 1,269 g $MgCl_2$ in 125 ml VE-Wasser lösen ▪ mit HCl auf pH 9,5 einstellen
Chromogen-Substratlösung (<i>Fast Blue</i>)	▪ 1 mg <i>Fast Blue</i> in 1 ml Naphtol AS-MX-Phosphatpuffer mit 1 mM Levamisol lösen
Chromogen-Substratlösung (<i>Fast Red</i>)	▪ 1 mg <i>Fast Red</i> in 1 ml Naphtol AS-MX-Phosphatpuffer mit 1 mM Levamisol lösen
Citratpuffer	▪ 2,1 g $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ in 900 ml VE-Wasser lösen mit NaOH auf pH 6,0 einstellen ▪ mit VE-Wasser auf 1 l auffüllen
DAB-Substratlösung	▪ 10 mg DAB in 20 ml TBS lösen ▪ davon 1 ml mit 10 µl H_2O_2 -Lösung mischen
FA/SSC _(2x)	▪ 40 ml FA mit 40 ml SSC _(4x) mischen

H ₂ O ₂ -Lösung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 20 µl H₂O₂ (30%) mit 500 µl VE-Wasser mischen
Hybridisierungsgemisch	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 3,8 mg <i>salmon testes</i> DNA in 380 µl ampuwa lösen, aufkochen und scheren ▪ davon 330 µl mit 1 g Dextransulfat, 2,2 µl 0,5 M EDTA, 1 ml SSC(20x) und 3,668 ml ampuwa mischen ▪ anschl. 1:1 mit FA mischen
Naphtol AS-MX-Phosphat-Puffer mit 1mM Levamisol	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 2 mg Naphtol AS-MX-Phosphat in 200 µl Dimethylformamid lösen ▪ 9,8 ml Tris/HCl-Puffer (0,1 M, pH 8,2) und 2,4 mg Levamisol zugeben
NBT/BCIP-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 17,5 µl NBT/BCIP mit 1 ml alkalischem Substratpuffer mischen
Paraformaldehyd-Lösung (1%)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 2 g Paraformaldehyd in 95 ml VE-Wasser lösen ▪ unter Zugabe von 150 µl 1 N NaOH auf ca. 60°C erwärmen ▪ rühren bis die Lösung klar ist ▪ 95 ml PBS_(2x) und 10 ml 1 M MgCl₂-Lösung zugeben
PBS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PBS_(10x) Stammlösung 1:10 mit VE-Wasser verdünnen ▪ mit HCl auf pH 7,2 einstellen
PBS _(10x) Stammlösung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 80 g NaCl, 2 g KCl, 2g KH₂PO₄ und 14,24 g Na₂HPO₄·2H₂O in 900 ml VE-Wasser lösen ▪ mit VE-Wasser auf 1 l auffüllen
PBS _(2x)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ PBS_(10x) Stammlösung 1:5 mit VE-Wasser verdünnen ▪ mit HCl auf pH 7,2 einstellen
PBS/BSA/Azid	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 0,2 g BSA und 0,02 NaN₃ in 20 ml PBS lösen
PBS/MgCl ₂	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 10 ml 1 M MgCl₂-Lösung in 190 ml PBS lösen
Pepsin-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 2 mg Pepsin in 1 ml 0,01 N HCl lösen
Protease Typ XIV-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 1 mg Protease Typ XIV auf 2 ml TBS
RNase-Lösung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 10 mg RNase A in 1 ml Tris/HCl/NaCl lösen ▪ 15 min aufkochen und abkühlen lassen ▪ davon 10 µl mit SSC_(2x) auf 1 ml auffüllen
SSC _(0,1x)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ SSC_(20x) Stammlösung 1:200 mit VE-Wasser verdünnen

SSC _(20x) Stammlösung	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 175,32 g NaCl und 88,23 g C₆H₅Na₃O₇·2H₂O in 900 ml VE-Wasser lösen ▪ mit HCl auf pH 7,0 einstellen ▪ mit VE-Wasser auf 1 l auffüllen
SSC _(2x)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ SSC_(20x) Stammlösung 1:10 mit VE-Wasser verdünnen
SSC _(4x)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ SSC_(20x) Stammlösung 1:5 mit VE-Wasser verdünnen
TBS	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 6,05 g Tris Base und 9 g NaCl in 900 ml VE-Wasser lösen ▪ mit HCl auf pH 7,6 einstellen ▪ mit VE-Wasser auf 1 l auffüllen
Tris/HCl/NaCl	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 0,121 g Tris Base und 0,876 g NaCl in 80 ml VE-Wasser lösen ▪ mit HCl auf pH 7,5 einstellen ▪ mit VE-Wasser auf 100 ml auffüllen
Tris/HCl-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 12,1 g Tris Base in 800 ml VE-Wasser lösen ▪ mit HCl auf pH 8,2 einstellen ▪ mit VE-Wasser auf 1 l auffüllen

2.1.4 Statistische Auswertung und Diagramme

Die statistische Auswertung und die Erstellung der Diagramme erfolgten mit der Software IBM SPSS Statistics 18[®] (Ehningen, Deutschland).

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchstiere

Die Transplantationen wurden an 220 bis 280 g schweren Ratten durchgeführt. Die Tiere der Rattenstämme „Lewis“ (LEW RT1^l) und „Dark Agouti“ (DA RT1^{av1}) wurden von der Firma Harlan Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen. Sie wurden bei Raumtemperatur und freiem Zugang zu Wasser sowie pelletierter Nahrung (Harlan Teklad Global Rodent[®], Harlan Winkelmann GmbH, Borchen, Deutschland) unter konventionellen Bedingungen gehalten.

Eine Tierversuchsgenehmigung des Regierungspräsidiums Gießen lag vor.

2.2.2 Transplantation der Rattenlungen

Die Transplantationen wurden durch Frau Prof. Dr. Veronika Grau und Herrn PD Dr. Markus Hirschburger in der isogenen Rattenstammkombination „LEW auf LEW“ und der allogenen Rattenstammkombination „DA auf LEW“ durchgeführt. Bei den zur ISH bestimmten Tieren erfolgte die Transplantation vom weiblichen Spender auf den männlichen Empfänger. Die Tiere wurden mittels kurzzeitiger Inhalation von Isofluran und anschließender intraperitonealer Injektion von 90 mg Ketaminhydrochlorid pro kg Körpergewicht und 0,1 mg Medetomidinhydrochlorid pro kg Körpergewicht betäubt. Zum Schutz vor bronchialer Hypersekretion wurden 0,25 mg Atropinsulfat pro kg Körpergewicht intramuskulär verabreicht, den Spendertieren wurde zum Schutz vor Thrombosen der Lungengefäße 1000 IU Heparin pro kg Körpergewicht intravenös appliziert. Anschließend erfolgte die orotracheale Intubation mittels Venenverweilkanüle (Vasocan[®] Braunüle[®] 2,20 x 50 mm G 14 orange, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und die mechanische Beatmung mit Raumluft mittels Harvard Rodent Ventilator[®] (Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA). Das Atemzugvolumen betrug 2,5 ml bei 100 Atemzügen pro min und einem positiven end-expiratorischen Druck von 5 cm H₂O. Bei den orthotopen, linksseitigen Lungentransplantationen wurden die Gefäßanastomosen in *cuff*-Technik nach Mizuta⁹⁹ angelegt, die Bronchusanastomose erfolgte mittels End-zu-End-Einzelknopfnah. Die *cuffs* wurden aus Venenverweilkanülen (Abbocath[®]-T 16 G, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) hergestellt, die Bronchusnaht erfolgte mit einem nicht-resorbierbaren, monofilen Faden der Stärke 9-0

(Ethilon[®], Fa. Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland). Nach Beendigung der Transplantation wurde die Narkose mittels subkutaner Gabe von 0,5 mg Atipamezolhydrochlorid pro kg Körpergewicht antagonisiert und eine prophylaktische Antibiose mit 150 mg Ampicillin als Einmalgabe intraperitoneal verabreicht. Eine Immunsuppression erfolgte nicht.

2.2.3 Organexplantation und Fixierung

Die transplantierten Tiere wurden zu einem zuvor festgelegten Zeitpunkt (erster bis sechster Tag nach Transplantation) wie oben beschrieben narkotisiert und die gesamte Lunge mit dem transplantierten, linken Lungenflügel sowie dem nativen, rechten Lungenflügel in toto explantiert. Bei den Tieren, die zur Untersuchung der Proliferation herangezogen werden sollten, wurde 30 min vor der Tötung der Tiere 25 mg BrdU in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung (0,9%) intravenös injiziert.

Zur Fixierung der entnommenen Lungenpräparate wurden in diese über die Trachea 4% Paraformaldehyd in 0,1 molarem Phosphatpuffer, pH 7,2, für 20 min mit einem Druck von 20 cm H₂O instilliert. Anschließend wurde das Gesamtpräparat für 24 h bei 4°C in die gleiche Paraformaldehydlösung eingetaucht. Zur weiteren Untersuchung wurden die Präparate in 5 mm dicke Blöcke zerteilt und in Paraffin eingebettet. Von den Organblöcken wurden 5-7 µm dicke Schnitte angefertigt, auf silanisierte, gläserne Objektträger aufgebracht und getrocknet.

2.3 Immunhistochemie

2.3.1 Immunhistochemische Doppelfärbungen mit den Antikörpern OX6 bzw. OX76 und ED1

Es waren zuvor 19 allogene Transplantationen (DA auf LEW) durchgeführt worden. Hiervon wurden 4 Tiere am ersten postoperativen Tag und jeweils 3 Tiere am zweiten bis sechsten postoperativen Tag getötet und die Lungen wie oben beschrieben explantiert und fixiert. Die Färbungen erfolgten sowohl an Schnitten der transplantierten, linken Spenderlunge als auch der nativen, rechten Empfängerlunge. Die Schnittpräparate wurden initial in Küvetten mit Xylol und Isopropanol in absteigender Konzentration wie folgt entparaffiniert und anschließend in Küvetten mit VE-Wasser und TBS gesetzt.

Xylol	3 x 10 min
100% Isopropanol	2 x 3 min
90% Isopropanol	3 min
80% Isopropanol	3 min
70% Isopropanol	3 min
50% Isopropanol	3 min
VE-Wasser	3 min
TBS	3 min

Es folgte die Antigendemaskierung mittels 50 µl Protease Typ XIV-Lösung pro Schnitt für 15 min bei Raumtemperatur. Die Protease wurde mittels PBS abgespült und die Schnitte für dreimal 2 min in Küvetten mit PBS eingestellt. Die Schnitte wurden mit jeweils 50 µl PBS/BSA/Azid für 30 min bedeckt und nach Abschütteln desselben mit 40 µl der Primärantikörperlösung von OX6 bzw. OX76 bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 2 h wurden die Schnitte dreimal mit PBS abgespült und mit *anti-mouse*-Envision AP mit 5% Normalrattenserum (40 µl pro Schnitt) für 30 min bei Raumtemperatur bedeckt. Nach dreimaligem Abspülen mit Tris/HCl-Puffer erfolgte die Färbung durch Inkubation mit 80 µl Chromogen-Substratlösung (Fast Blue) pro Schnitt bei Dunkelheit. Nach 20 min wurde das Substrat dreimalig mit PBS abgespült.

Zur Vorbereitung des zweiten Färbeschrittes wurden die bereits gebundenen Antikörper und Nachweisreagenzien durch 15 minütige Behandlung der Schnitte in Citratpuffer (pH 6,0) bei 120° C und 1,1 bar entfernt. Die Schnitte wurden erneut für dreimal 2 min in Küvetten mit PBS eingestellt. In der Folge wurden die Präparate auf den Objektträgern mit verdünntem Klebstoff eingekreist und begrenzt. Sie wurden mit jeweils 50 µl PBS/BSA/Azid für 30 min bedeckt und nach dem Abschütteln mit 40 µl der primären ED1-Antikörperlösung pro Schnitt über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Primärantikörper wurde dreimal mit PBS abgespült und anschließend *anti-mouse*-Envision AP mit 5% Normalrattenserum (40 µl pro Schnitt) für 30 min bei Raumtemperatur zugeführt. Nach dreimaligem Abspülen mit Tris/HCl-Puffer erfolgte die Färbung durch Inkubation mit 80 µl Chromogen-Substratlösung (Fast Red) pro Schnitt für 20 min bei Dunkelheit. Nach dreimaligem Abspülen des Substrates mit PBS wurden die Objektträger in eine mit PBS gefüllte Küvette gesetzt und nach Ablösen des Klebstoffringes mit Glycergel eingedeckt. Zur Kontrolle wurde der Färbevorgang zusätzlich sowohl für jeden Antikörper allein als auch ausschließlich mit Kontrolllösungen durchgeführt.

2.3.2 ISH und Färbung mit dem Antikörper ED1

Hierzu waren vier allogene Transplantationen (DA auf LEW) und drei isogene Transplantationen (LEW auf LEW) wie oben beschrieben durchgeführt worden. Als Spenderratten wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet, alle Empfängerratten waren männlichen Geschlechts. Die sieben Tiere wurden am vierten postoperativen Tag ebenso wie eine nichttransplantierte weibliche „Lewis“-Ratte getötet und die Lungen wie oben beschrieben explantiert und fixiert. Die Untersuchung erfolgte am vierten postoperativen Tag, da die Doppelfärbungen mit den Antikörpern OX6 bzw. OX76 und ED1 und die Arbeit von Schmidt et al.¹¹⁶ aus unserer Arbeitsgruppe gezeigt haben, dass zu diesem Zeitpunkt ein ausgeprägtes Infiltrat nachweisbar ist.

Die Untersuchung erfolgte sowohl an Schnitten der transplantierten, linken, weiblichen Spenderlungen als auch der nativen, rechten, männlichen Empfängerlungen und beiden Lungen des nichttransplantierten weiblichen Kontrolltieres.

Die Schnittpräparate wurden zweimal 10 min in Küvetten mit Xylol entparaffiniert, 10 min in eine Küvette mit 100%igem Ethanol getaucht, luftgetrocknet und anschließend

in Küvetten mit zweifach konzentriertem *standard-saline-citrate*-Puffer ($\text{SSC}_{(2x)}$) gesetzt. Im Weiteren wurden die Präparate, um potentiell vorhandene RNA zu degradieren, für 1 h mit 100 μl RNase-Lösung pro Schnitt bei 37°C inkubiert. Die RNase wurde in drei Waschschritten à 5 min mit $\text{SSC}_{(2x)}$ entfernt. Zur Freilegung der DNA wurden die Objektträger kurz in eine Küvette mit 0,2 normale Salzsäure bei 37°C gesetzt, mit 0,01 normaler Salzsäure gespült und darauf für 20 min bei 37°C mit 100 μl Pepsin-Lösung pro Schnitt bedeckt. Die Präparate wurden nun zweimal für 5 min in Küvetten mit PBS und einmal 5 min in eine Küvette mit PBS/ MgCl_2 gestellt, anschließend für 10 min in einer Küvette mit 1%igem Paraformaldehyd auf Eis nachfixiert. Das Fixans wurde durch kurzes Eintauchen in PBS sowie zweimaliges Einstellen für 5 min in Küvetten mit PBS ausgewaschen und anschließend die Objektträger für 5 min in eine Küvette mit $\text{SSC}_{(2x)}$ gesetzt.

Nun erfolgte ein Prä-Hybridisierungsschritt mit je 10 μl Hybridisierungsgemisch pro Schnitt unter einem Deckgläschen ohne Zusatz der DNA-Sonde zum Nachweis des Y-Chromosoms für 1,5 h bei 37°C. Die Präparate wurden kurz mit $\text{SSC}_{(2x)}$ und VE-Wasser abgespült und zur Vermeidung eines Verdünnungseffektes durch Flüssigkeitsreste bei der folgenden Hybridisierung für jeweils 3 min in Küvetten 70%, 90% und 100%igem Ethanol auf Eis entwässert und anschließend luftgetrocknet. Zur eigentlichen Hybridisierung wurde auf jeden Schnitt 10 μl Hybridisierungsgemisch unter Zusatz der Digoxigenin-markierten DNA-Sonde (123,28 $\mu\text{g/ml}$) zum Nachweis des Y-Chromosoms pipettiert, mit einem Deckgläschen bedeckt und mit einem Montagekleber versiegelt. Nach einer zehnminütigen Denaturierung bei 90°C folgten 72 h Inkubation bei 37°C.

Nach Entfernung der Versiegelung wurden die Objektträger für 5 min in einer Küvette mit $\text{SSC}_{(2x)}$ bei 40°C gewaschen. Zur Lösung unspezifischer Sondenbindungen wurden die Schnittpräparate 15 min in FA/ $\text{SSC}_{(2x)}$ bei 44°C, je dreimal 5 min in $\text{SSC}_{(0,1x)}$ bei 40°C und 3 min in $\text{SSC}_{(4x)}$ mit Zusatz von 0,1% Tween bei Raumtemperatur gesetzt und anschließend zweimal für 5 min in Küvetten mit PBS ausgewaschen. Die Schnitte wurden mit jeweils 100 μl PBS/BSA/Azid für 30 min bedeckt und nach Abschütteln desselben mit 100 μl der anti-Digoxigenin-Primärantikörperlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 1 h wurden die Schnitte mit alkalischem Substratpuffer abgespült und mit 100 μl NBT/BCIP-Lösung pro Schnitt bei Dunkelheit bedeckt. Nach 20 min wurde die Substratlösung mit PBS abgespült und die Objektträger in eine Küvette mit PBS gesetzt.

Sie wurden mit jeweils 50 µl PBS/BSA/Azid für 30 min bedeckt und nach dem Abschütteln mit 50 µl der ED1-Antikörperlösung pro Schnitt über Nacht bei 4°C inkubiert. Die anschließende Färbung mit Fast Red erfolgte wie bereits zuvor beschrieben. Anschließend wurden die Objektträger mit Glycergel eingedeckt. Zur Kontrolle wurde der Färbeprogang zusätzlich sowohl ohne die DNA-Sonde zum Nachweis des Y-Chromosoms bei der Hybridisierung, als auch ohne den Antikörper ED1 und ausschließlich mit Kontrolllösungen durchgeführt.

2.3.3 Immunhistochemische Doppelfärbung mit den Antikörpern ED1 bzw. ED2 und Bu20a

Es waren zuvor vier allogene Transplantationen (DA auf LEW) und vier isogene Transplantationen (LEW auf LEW) durchgeführt worden. Diesen acht Tieren wurde am zweiten postoperativen Tag 25 mg BrdU in 1 ml NaCl intravenös injiziert. 30 min später wurden die Tiere getötet. Auch vier nicht transplantierte Kontrolltiere wurden nach Pulsmarkierung mit BrdU getötet. Die Lungen der Tiere wurden wie oben beschrieben explantiert und fixiert. Die Untersuchung erfolgte am zweiten postoperativen Tag, da die Arbeit von Schmidt et al.¹¹⁶ aus unserer Arbeitsgruppe gezeigt hat, dass der Anstieg der Makrophagenzahl im Infiltrat zwischen Tag zwei und Tag drei am größten ist.

Die Färbungen erfolgten sowohl an Schnitten der transplantierten, linken Spenderlunge (im Falle der Kontrolltiere der nativen, linken Lunge) als auch der nativen, rechten Lunge.

Die Entparaffinierung und Antigendemaskierung mittels Protease erfolgte wie oben beschrieben. Zur Inkubation mit der Primärantikörperlösung von ED1 bzw. ED2 wurden 40 µl pro Schnitt für 2 h bei Raumtemperatur zugeführt. Auch die anschließende Färbung mit Chromogen-Substratlösung (Fast Blue) erfolgte inklusive der Spülvorgänge wie oben bereits geschildert. Nach dem dreimaligen Abspülen der Substratlösung mit PBS wurden die Präparate kurz in VE-Wasser eingetaucht. Es folgte die erneute Antigendemaskierung und Lösung der bestehenden Antikörperbindungen durch ein 10 minütiges Bad in 0,1 normaler Salzsäure mit 0,9% NaCl bei 60°C. Die Schnitte wurden mit PBS abgespült und in eine Küvette mit PBS gesetzt. Die Präparate wurden auf den Objektträgern mit verdünntem Klebstoff eingekreist und begrenzt. Nachdem sie für 30 min mit 50 µl PBS/BSA/Azid pro Schnitt bedeckt wurden, erfolgte die Inkubation nun mit der primären

Bu20a-Antikörperlösung (40 µl pro Schnitt) über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Antikörperlösung dreimal mit PBS abgespült und pro Schnitt 40 µl *anti-mouse*-Immunglobulin (1:70 verdünnt mit PBS) mit 5% Normalrattenserum für 60 min bei Raumtemperatur aufgebracht. Nach dreimaligem Abspülen mit TBS erfolgte die Färbung durch Inkubation mit 50 µl DAB-Substratlösung pro Schnitt für 10 min bei Raumtemperatur. Nachdem die Objektträger dreimal mit PBS abgespült und in eine mit PBS gefüllte Küvette gesetzt worden waren, wurden sie mit Glycergel eingedeckt. Zur Kontrolle wurde der Färbevorgang zusätzlich sowohl für jeden Antikörper allein, als auch ausschließlich mit Kontrolllösungen durchgeführt.

2.4 Auswertung

2.4.1 Makrophagenherkunft (immunhistochemische Doppelfärbungen)

Die gefärbten Präparate der linken, transplantierten Spenderlungen wurden unter dem Mikroskop Olympus-BX51® (Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) bei unter zu Hilfenahme der Software analySIS® V3.2 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland) ausgewertet. Um den Anteil der Spenderalveolarmakrophagen in der transplantierten Lunge zu bestimmen, wurde im ersten Schritt der Anteil der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen in einer Doppelfärbung mittels der monoklonalen Antikörper ED1 und OX6 bestimmt. OX6 ist gegen ein monomorphes Epitop des MHC Klasse II-Moleküls in der Ratte (und damit sowohl der DA- als auch der LEW-Ratte) gerichtet. Mindestens 100 Alveolarmakrophagen aus mindestens zwei unterschiedlichen Regionen der Lunge wurden ausgezählt. Es wurde darauf geachtet, dass die gezählten Zellen aufgrund ihrer intraalveolären Lage und ihrer Form eindeutig Alveolarmakrophagen waren. Von diesen wurde der Anteil der MHC Klasse II-positiven Zellen bestimmt.

Im zweiten Schritt wurde über eine Doppelfärbung mit den monoklonalen Antikörpern ED1 und OX76 (erkennt ein polymorphes Epitop des MHC Klasse II-Moleküls der DA-Ratte) der Anteil der Alveolarmakrophagen bestimmt, die MHC Klasse II-positiv sind und ihren Ursprung beim Spender haben. Die Zellen wurden auf die gleiche Weise ausgezählt.

2.4.2 Makrophagenherkunft (In-situ-Hybridisierung)

Wie bereits zuvor angegeben wurden an den gefärbten Präparaten der männlichen, rechten Kontrolllungen sowie der weiblichen, linken Spenderlungen 50 mittels ED1 angefärbte Alveolarmakrophagen aus mindestens zwei unterschiedlichen Regionen des Anschnittes ausgezählt. Dabei wurde der Anteil der Makrophagen bestimmt, bei denen durch einen blauschwarzen Punkt im Kern das Y-Chromosom und damit der männliche Ursprung nachweisbar war. Da nicht in jedem Anschnitt männlicher Zellen das Y-Chromosom getroffen und nachweisbar ist, wurde der Anteil der eingewanderten, männlichen Zellen systematisch unterschätzt. Um diesen Fehler auszugleichen, wurde der Anteil der Alveolarmakrophagen mit Y-Chromosomnachweis in männlichen

Kontrolllungen bestimmt. Daraus ergab sich ein Normierungsfaktor, mit dem die Ergebnisse aus den weiblichen Spenderlungen multipliziert wurden.

2.4.3 DNA-Synthese in Makrophagen

Mindestens 100 mittels ED1 blau gefärbte Alveolarmakrophagen aus mindestens zwei unterschiedlichen Regionen der Lungen wurden ausgezählt. Es wurde der prozentuale Anteil der Makrophagen bestimmt, in deren Zellkern in die DNA eingebautes BrdU mit dem monoklonalen Antikörper Bu20a nachweisbar war. In gleicher Weise wurden Präparate ausgewertet, die mit den monoklonalen Antikörpern ED2 und Bu20a doppelt gefärbt waren. Hierdurch konnte der Anteil der interstitiellen Makrophagen bestimmt werden, die DNA synthetisieren.

3 Ergebnisse

3.1 Herkunft der Alveolarmakrophagen

3.1.1 MHC Klasse II-positive Alveolarmakrophagen

Eine Bestimmung der Alveolarmakrophagen des Spenders, in unserem Falle der DA-Ratte, kann über den monoklonalen Antikörper OX76 erfolgen. Da dieser jedoch nur MHC Klasse II-positive Makrophagen detektiert, ist es von Bedeutung den Anteil aller MHC Klasse II-positiven Makrophagen an der Gesamtpopulation zu kennen. Es wurden hierzu, wie oben beschrieben, Doppelfärbungen mit den monoklonalen Antikörpern ED1 und OX6 durchgeführt.

Hierbei zeigten die Alveolarmakrophagen eine kräftige Rotfärbung. Auch die Monozyten zeigten diese Färbung, sie waren jedoch aufgrund ihrer Größe und der intravasalen Lage von den Alveolarmakrophagen gut zu unterscheiden. Die MHC Klasse II-positiven Zellen wiesen eine deutliche Blaufärbung der Zellmembran auf. Die Organstruktur war zwar blass, jedoch deutlich zu erkennen. In den Kontrollfärbungen ohne ED1 fehlte die rote Färbung, in denen ohne OX6 war die Zellmembran nicht blau gefärbt. Die Kontrollen ohne Antikörperzugabe zeigten lediglich einen blass-bläulichen Hintergrund.

An Tag eins nach der Transplantation waren in den Präparaten der Transplantationen mäßig viele Alveolarmakrophagen feststellbar. Die MHC Klasse II-Expression lag im Median bei 4,7%. Im weiteren Zeitverlauf kam es zu einer raschen Zunahme der Zelldichte in den Alveolen, der Anteil der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen blieb an Tag zwei noch bei 2,9% im Median, stieg dann jedoch auf 22,1% an Tag drei und 25,1% an Tag vier im Median an.

Am den Tagen fünf und sechs waren die Organe so stark geschädigt, dass eine Auswertung nicht möglich war.

Die Anteile der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen an der Gesamtpopulation der Alveolarmakrophagen sind in für die einzelnen Tiere in Tab. 3 zusammengestellt.

Tab. 3 Anteil der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen an der Gesamtpopulation der Alveolarmakrophagen in allogenen Lungentransplantaten der Ratte

Tag nach Transplantation	Tier	Anteil
Tag 1	1	8,5%
	2	0,8%
	3	13,8%
	4	0,9%
	Median	4,7%
Tag 2	5	4,2%
	6	1,0%
	7	2,9%
	Median	2,9%
Tag 3	8	14,0%
	9	22,1%
	10	23,8%
	Median	22,1%
Tag 4	11	29,6%
	12	25,1%
	13	24,8%
	Median	25,1%

3.1.2 Alveolarmakrophagen mit Spendertyp-MHC Klasse II

Die Auswertung der Doppelfärbung mit den monoklonalen Antikörpern ED1 und OX6 zeigt, dass der prozentuale Anteil der MHC II-positiven Alveolarmakrophagen an den Tagen eins und zwei nach Transplantation mit 4,7% und 2,9% im Median gering ausfällt. An den folgenden Tagen steigt der Anteil dieser Subpopulation auf 22,1% und 25,1% der Gesamtpopulation im Median an. Da nur die MHC Klasse II-positiven Zellen des Spenders mit dem monoklonalen Antikörper OX76 angefärbt werden können, verzichteten wir auf die weitere Auswertung der Tage eins und zwei.

Es wurden Doppelfärbungen mit den monoklonalen Antikörpern ED1 und OX76 durchgeführt und die Präparate der Lungen, die am dritten und vierten postoperativen Tag explantiert wurden, ausgezählt. Aufgrund der gleichen wie zuvor verwandten Substratlösungen ähnelten diese Präparate den zuvor beschriebenen. Die Alveolarmakrophagen wiesen eine kräftige Rotfärbung auf, die Zellmembranen der MHC

Klasse II-positiven Zellen vom Spendertyp waren blau (Abb. 1). Wie auch zuvor fehlte in den Kontrollfärbungen ohne ED1 die rote, in denen ohne OX76 die blaue Färbung. Die Präparate ohne Antikörper waren weitgehend ungefärbt geblieben.

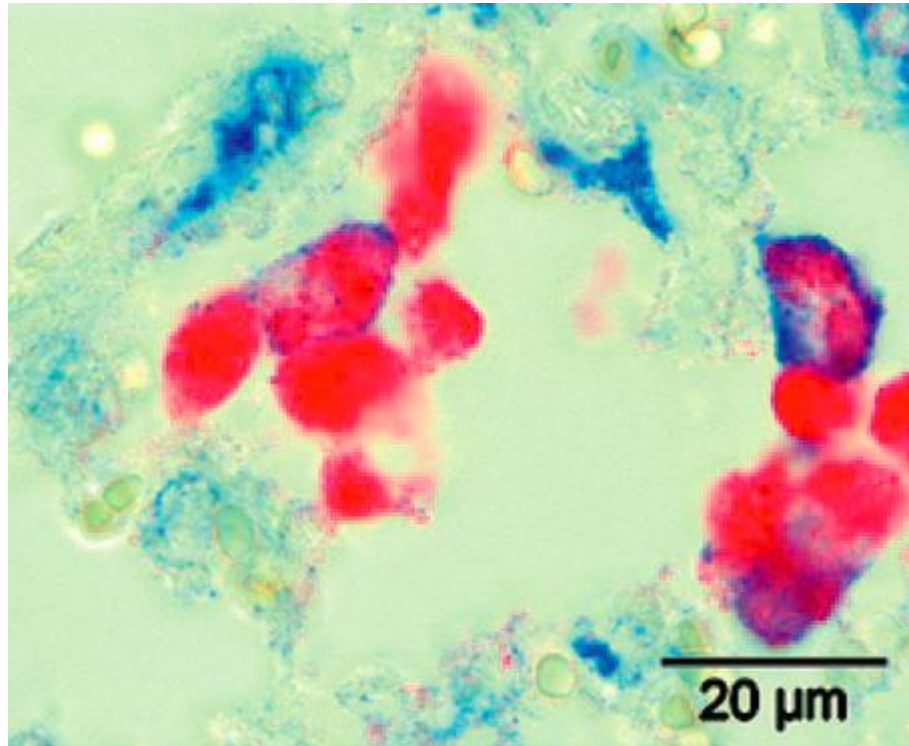


Abb. 1: Allogenes Lungentransplantat (DA auf LEW), Tag 4, Paraffinschnitt, immunhistochemische Doppelfärbung mit ED1 (rot) und OX 76 (blau): Alveolarmakrophagen stellen sich rot dar, MHC Klasse II-positive Alveolarmakrophagen der DA-Ratte zeigen eine blaue Zellmembran.

Der Anteil der Spendertyp-MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen an der Gesamtpopulation der Alveolarmakrophagen lag an Tag drei bei 9,0% und an Tag vier bei 6,8% im Median. Die Werte der einzelnen Tiere sind in Tab. 4 angegeben.

Tab. 4 Anteil der Spendertyp-MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen an der Gesamtpopulation der Alveolarmakrophagen in allogenen Lungentransplantaten der Ratte

Tag nach Transplantation	Tier	Anteil
Tag 3	8	4,4%
	9	9,0%
	10	10,5%
	Median	9,0%
Tag 4	11	7,0%
	12	6,8%
	13	5,3%
	Median	6,8%

Da Tab. 3 den Anteil der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen an der Gesamtpopulation der Alveolarmakrophagen und Tab. 4 den Anteil der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen, die vom Spender (DA-Ratte) stammen, an der Gesamtpopulation der Alveolarmakrophagen angibt, lässt sich aus den beiden Datensätzen der prozentuale Anteil der Spenderalveolarmakrophagen im Transplantat errechnen (siehe Tab. 5). Diese Daten dürfen aufgrund der komplexen Methode nur als semiquantitative Abschätzung gewertet werden.

Tab. 5 Anteil der Spenderalveolarmakrophagen an der Gesamtpopulation der Alveolarmakrophagen in allogenen Lungentransplantaten der Ratte

Tag nach Transplantation	Tier	Anteil
Tag 3	8	31,4%
	9	40,7%
	10	44,1%
	Median	40,7%
Tag 4	11	23,6%
	12	27,1%
	13	21,4%
	Median	23,6%

Wie zu erwarten, waren in den nichttransplantierten Lungen, welche als Kontrollgruppe untersucht wurden, keine Spenderzellen nachweisbar.

3.1.3 Alveolarmakrophagen mit Spenderkaryotyp

Es wurden wie oben beschrieben die ISH und die anschließende immunhistochemische Färbung mit dem monoklonalen Antikörper ED1 durchgeführt und die Präparate der Lungen ausgezählt. Die Alveolarmakrophagen zeigten wie bereits zuvor im Zytoplasma eine rote Färbung. In den Kernanschnitten einiger Zellen war das Y-Chromosom als blauschwarzer Punkt nachgewiesen (Abb. 2). In den Kontrollen ohne ED1 fehlte die Rotfärbung, in denen ohne die Digoxigenin-markierte Sonde zum Nachweis des Y-Chromosoms waren keine Punkte in den Zellkernen zu finden.

Bei den isogen transplantierten Tieren war das Y-Chromosom im Median bei 12% der Alveolarmakrophagen im Transplantat nachweisbar. In der nicht transplantierten Lunge lag der Wert bei 46% im Median. In den allogenen Transplantaten betrug der Anteil 22%, in den nativen Lungen der allogenen transplantierten Tiere war das Y-Chromosom bei 50% der Alveolarmakrophagen nachweisbar.

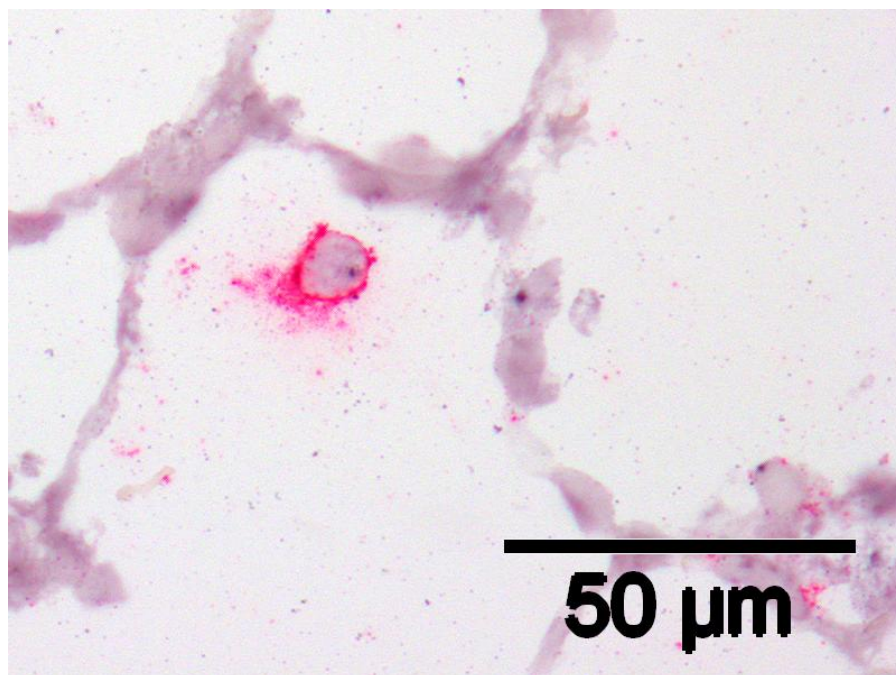


Abb. 2: Allogenes Lungentransplantat (DA auf LEW, Spender weiblich, Empfänger männlich), Tag 4, Paraffinschnitt, in situ Hybridisierung und immunhistochemische Färbung mit ED1 (rot): Alveolarmakrophagen stellen sich rot dar, männliche Zellen zeigen eine blauschwarzen Punkt im Kern.

Für die einzelnen Tiere ergaben sich die in Tab. 6 angegebenen Anteile der nachgewiesenen männlichen Zellen an der Gesamtzahl der Alveolarmakrophagen für die isogene und die allogene Gruppe.

Tab. 6 Anteil der Alveolarmakrophagen mit nachgewiesenem Y-Chromosom an der Gesamtpopulation der Alveolarmakrophagen in allogenen und isogenen Lungentransplantaten der Ratte (Spender weiblich, Empfänger männlich)

	Tier	rechte (native) Lunge	linke (transplantierte) Lunge
isogene Transplantation	1	44%	12%
	2	50%	8%
	3	46%	22%
	Median	46%	12%
allogene Transplantation	4	54%	30%
	5	46%	14%
	6	52%	20%
	7	48%	24%
	Median	50%	22%

Es ist davon auszugehen, dass in der rechten, vom männlichen Empfänger stammenden Lunge nahezu alle Zellen männlichen Ursprungs sind. Da sich nur bei etwa der Hälfte der Alveolarmakrophagen dieser Lunge das Y-Chromosom nachweisen lässt, wurde für jedes Tier ein Normierungsfaktor bestimmt. Die Nachweisbarkeit des Y-Chromosoms hängt einerseits von der Dicke der Lungenschnitte ab, andererseits von der Zugänglichkeit der DNA, die von unvermeidlichen Schwankungen in der Fixierung und Gewebeeinbettung bestimmt sein könnte. Mit diesem Faktor wurden die für die linke Lunge bestimmten Werte multipliziert, um den Anteil der eingewanderten, männlichen Alveolarmakrophagen abzuschätzen (siehe Tab. 7).

Tab. 7 Anteil der männlichen Alveolarmakrophagen an der Gesamtpopulation der Alveolarmakrophagen in weiblichen, allogenen und isogenen Lungentransplantaten der Ratte (Spender weiblich, Empfänger männlich)

	Tier	Normierungsfaktor	linke (transplantierte) Lunge
isogene Transplantation	1	2,3	27,3%
	2	2,0	16,0%
	3	2,2	47,8%
	Median		27,3%
allogene Transplantation	4	1,9	55,6%
	5	2,2	30,4%
	6	1,9	38,5%
	7	2,1	50,0%
	Median		44,3%

3.2 Proliferation von Makrophagen der Lunge

3.2.1 Alveolarmakrophagen

Wird einem Individuum BrdU zugeführt, so bauen die Zellen in der DNA-Synthese dies anstelle von Thymidin in den Basenstrang ein⁴². Es war unser Ziel, durch eine Pulsmarkierung mit BrdU 30 min vor der Tötung der Tiere und dem anschließenden Nachweis des Thymidinanalogons in der DNA Zellen in der S-Phase des Zellzyklus zu bestimmen. Es wurden Doppelfärbungen mit den monoklonalen Antikörpern Bu20a und ED1 an den linken (transplantierten) sowie den rechten (nativen) Lungen bei allogenen und isogen transplantierten Tieren sowie nicht transplantierten Kontrolltieren durchgeführt und die so gewonnenen Präparate ausgewertet. Die Alveolarmakrophagen zeigten hierbei eine Blaufärbung der lysosomalen Membranen im Zytoplasma. Zellen, die im Rahmen der DNA-Synthese BrdU anstelle von Thymidin inkorporierten, wiesen einen braunen Zellkern auf (Abb. 3). In den Kontrollen ohne ED1 fehlte die blaue Farbe. In Abwesenheit von Bu20a blieben sämtliche Zellkerne ungefärbt. Die Kontrollfärbungen ohne ED1 und Bu20a zeigten eine schwach bläuliche Hintergrundfärbung, die charakteristischen Färbungen von Kern und Lysosomen blieben aus.

Bei den nicht transplantierten Lungen der Kontrolltiere zeigten die rechten Lungen einen Anteil der Alveolarmakrophagen in DNA-Synthese an der Gesamtpopulation der Alveolarmakrophagen von 4,2% und in den linken, ebenfalls nativen Lungen von 6,1% im Median. Dieser Anteil betrug bei den rechten, nativen Lungen der isogen transplantierten Tiere 8,3% im Median und in den linken Transplantatlungen 17,1% im Median. Bei den allogenen transplantierten Tieren inkorporierten in den rechten, nativen Lungen 7,0% BrdU, in den linken Transplantatlungen waren dies 16,3% im Median.

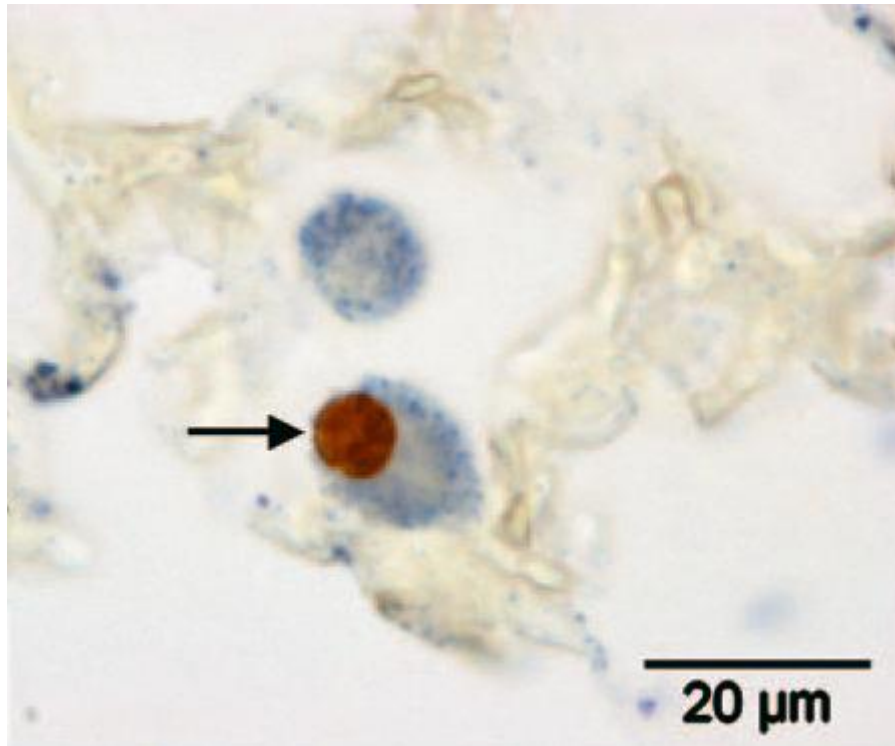


Abb. 3: Allogenes Lungentransplantat (DA auf LEW), Tag 2, Paraffinschnitt, immunhistochemische Doppelfärbung mit Bu20a (braun) und ED1 (blau): Alveolarmakrophagen stellen sich blau dar, Zellen, die BrdU in die DNA einbauen, zeigen einen braunen Zellkern

Die Einzelergebnisse sind in Tab. 8 aufgeführt und in Abb. 4 graphisch dargestellt.

Tab. 8 Anteil der Alveolarmakrophagen in DNA-Synthese an der Gesamtpopulation der Alveolarmakrophagen

	Tier	rechte (native) Lunge	linke (native) Lunge
Kontrolltiere	1	3,3%	4,6%
	2	5,0%	6,7%
	3	2,8%	6,3%
	4	5,1%	5,8%
	Median	4,2%	6,1%
	Tier	rechte (native) Lunge	linke (transplantierte) Lunge
isogene Transplantation	5	4,9%	17,9%
	6	12,3%	19,1%
	7	11,6%	13,1%
	8	4,0%	16,2%
	Median	8,3%	17,1%
allogene Transplantation	9	3,5%	11,4%
	10	8,5%	21,1%
	11	13,2%	21,8%
	12	5,5%	9,6%
	Median	7,0%	16,3%

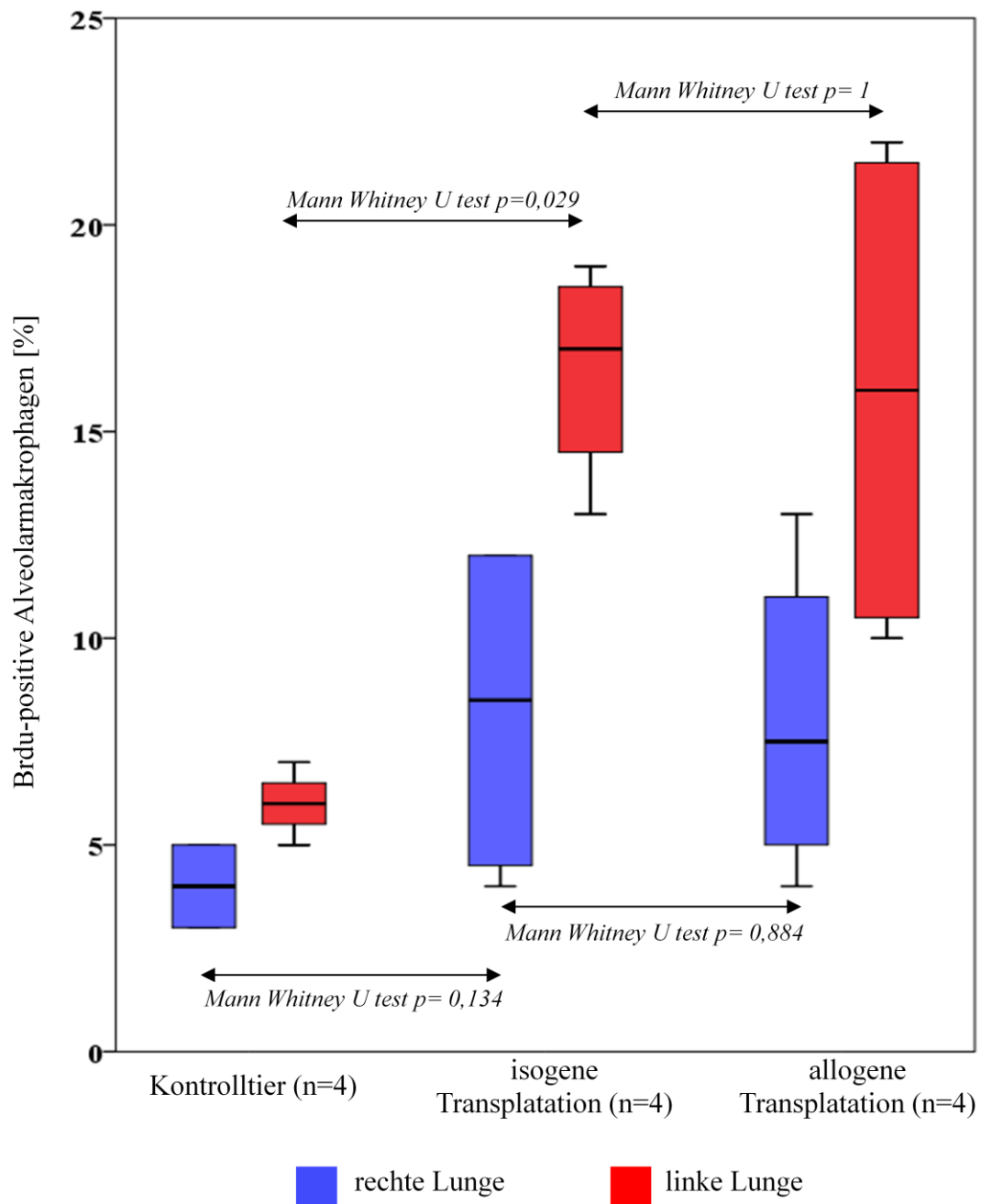


Abb. 4: Anteil der Alveolarmakrophagen in DNA-Synthese an der Gesamtpopulation der Alveolarmakrophagen

3.2.2 Interstitielle Makrophagen

Um die DNA-Synthese in interstitiellen Makrophagen der Lungentransplantate zu analysieren, wurden Doppelfärbungen mit den Antikörpern Bu20a und ED2 durchgeführt. ED2 erkennt CD163, das typischerweise von den interstitiellen Makrophagen der Lunge exprimiert wird. Daher kam es bei den Präparaten zu einer Blaufärbung der interstitiellen

Makrophagen und einer Braunfärbung des Kerns der Zellen, die BrdU inkorporierten (Abb. 5). Wie bereits zuvor blieb bei den Kontrollen ohne Bu20a die Braunfärbung des Zellkerns aus, die interstitiellen Makrophagen in den Kontrollen ohne ED2 waren ungefärbt. Die Kontrollen ohne die beiden Antikörper blieben insgesamt weitgehend ungefärbt.

Sowohl in den nativen Lungen der Kontrolltiere, als auch den rechten, nativen Lungen der isogen und allogenen transplantierten Tiere war kein BrdU-Einbau in die DNA nachweisbar. In den linksseitigen Lungentransplantaten war jedoch die DNA-Synthese anhand des braunen Zellkerns nachweisbar. Bei den interstitiellen Makrophagen in den isogenen Transplantaten war der Anteil der Zellen mit BrdU-Inkorporation 6,5%, bei den allogenen Transplantaten 10,0% im Median.

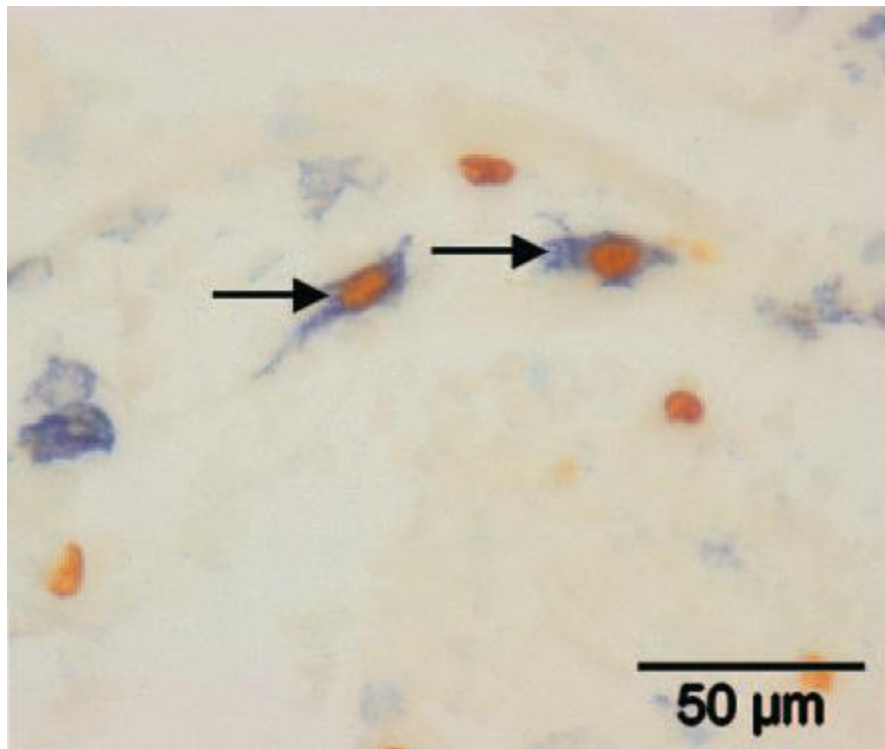


Abb. 5: Allogenes Lungentransplantat (DA auf LEW), Tag 2, Paraffinschnitt, immunhistochemische Doppelfärbung mit Bu20a (braun) und ED2 (blau): interstitielle Makrophagen stellen sich blau dar, Zellen, die BrdU in die DNA einbauen, zeigen einen braunen Zellkern.

Die einzelnen Werte sind Tab. 9 zu entnehmen.

Tab. 9 Anteil der interstitiellen Makrophagen in DNA-Synthese an der Gesamtpopulation der interstitiellen Makrophagen

	Tier	rechte (native) Lunge	linke (native) Lunge
Kontrolltiere	1	nicht ausgezählt	0,0%
	2	nicht ausgezählt	0,0%
	3	nicht ausgezählt	0,0%
	4	nicht ausgezählt	0,0%
	Median		0,0%
	Tier	rechte (native) Lunge	linke (transplantierte) Lunge
isogene Transplantation	5	0,0%	7,0%
	6	0,0%	11,0%
	7	0,0%	4,0%
	8	0,0%	6,0%
	Median	0,0%	6,5%
allogene Transplantation	9	0,0%	9,0%
	10	0,0%	11,0%
	11	0,0%	11,0%
	12	0,0%	8,0%
	Median	0,0%	10,0%

4 Diskussion

4.1 Herkunft der Alveolarmakrophagen

Die Herkunft der Alveolarmakrophagen im Bezug auf Spender und Empfänger im Lungentransplantat ist anhand vorwiegend klinischer Studien an Patienten untersucht und ein unterschiedlich lange anhaltender Chimärismus nachgewiesen. Da es sich um klinische Studien am Menschen handelt, beschränkt sich das Untersuchungsmaterial auf Biopsien im Rahmen von Bronchoskopien⁷ und BALF^{78,112,142}. Die Unterscheidung zwischen Spender- und Empfängerzellen erfolgte über DNA-Analysen mittels PCR^{78,112} oder bei unterschiedlich geschlechtlichen Spendern und Empfängern über den Nachweis des Y-Chromosoms mittels ISH^{7,142}. Die Studien von Kjellström et al.⁷⁸ und Wiebe et al.¹⁴² wiesen mittels BAL und DNA-Analysen bzw. ISH einen Chimärismus jedoch ohne quantitative Aussage bis zum Ende der Studien nach 6 bzw. 24 Monaten nach. Bittmann et al.⁷ bezifferten mittels transbronchialen Biopsien und ISH den Chimärismus auf einen Anteil von 22,5% Spenderalveolarmakrophagen an der Gesamtpopulation. Rothmeier et al.¹¹² kommen mittels BAL und DNA-Analysen auf ähnliche Werte. Beide konnten Spendermakrophagen auch noch 2 Jahre nach der Transplantation nachweisen. Die Korrelation des Chimärismus mit dem klinischen Verlauf ist höchst heterogen. Während Kjellström et al.⁷⁸ und Wiebe et al.¹⁴² sich diesbezüglich nicht festlegen, beschreiben Rothmeier et al.¹¹² eine Korrelation zwischen einem Chimärismus über 30% nach einem Monat und einer geringeren Zahl an Abstoßungsepisoden im Verlauf. Bittmann et al.⁷ ziehen aus ihren Beobachtungen gegenteilige Schlüsse. Studien über den Chimärismus der Alveolarmakrophagen im Lungentransplantat der Ratte fehlen jedoch. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass auch in der Ratte ein erheblicher Chimärismus bestehen kann.

Der monoklonale Antikörper OX76 bindet an ein polymorphes Epitop des MHC II-Moleküls der DA-Ratte. So ist es möglich, Zellen zu detektieren, die MHC Klasse II-positiv sind und von der DA-Ratte abstammen¹³⁴. Der monoklonale Antikörper ED1 hingegen bindet an lysosomales Membranantigen von Alveolarmakrophagen, Monozyten und Dendritischen Zellen unabhängig, ob diese MHC Klasse II-positiv oder -negativ sind und unabhängig von welchem Rattenstamm sie herrühren³². Es ist also möglich mittels Doppelfärbung mit den monoklonalen Antikörpern ED1 und OX76 den Anteil der MHC

Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen des Spenders (DA-Ratte) zu bestimmen, den diese an der Gesamtpopulation der MHC Klasse II-positiven und -negativen Alveolarmakrophagen beider Tiere (Spender und Empfänger) ausmachen. Dies lässt natürlich nur indirekt Rückschlüsse auf eine prozentuale Verteilung zu. Um festzustellen, wie groß der Anteil der MHC Klasse II-positiven Spenderalveolarmakrophagen an der Gesamtheit der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen ist, muss daher erst der Prozentsatz der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen bestimmt werden. Der monoklonale Antikörper OX6 bindet an einem monomorphen Epitop der MHC Klasse II-Moleküle aller Rattenstämme⁹⁷, so dass mittels Doppelfärbung mit den monoklonalen Antikörpern ED1 und OX6 der Anteil MHC Klasse II-positiver Alveolarmakrophagen an der Gesamtpopulation unabhängig von ihrer Herkunft bestimmt werden kann. Hieraus sind dann Rückschlüsse möglich, wie groß der Anteil der Alveolarmakrophagen des Spenders an der Subpopulation der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen ist. Da eine ausreichende Expression des MHC Klasse II-Moleküls bei den Alveolarmakrophagen erst ab dem dritten Tag vorliegt und das Transplantat ab dem fünften Tag irreversibel zerstört ist, beschränken wir unsere Aussagen bezüglich der Herkunft der Alveolarmakrophagen auf den dritten und vierten Tag nach der Transplantation.

Im Median stammen am dritten Tag nach der Transplantation 40,7% der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen vom Transplantatspender, am vierten Tag waren dies noch 23,6%. Bei dieser Versuchsanordnung handelt es sich zwangsläufig um allogene Transplantationen, da die Herkunft der Zellen über die genetisch unterschiedlichen Rattenstämme nachgewiesen wird.

Wenn man jedoch Transplantationen von weiblichen Spendern auf männliche Empfänger vornimmt, lässt sich der Nachweis der Zellherkunft über die Detektion des Y-Chromosoms per ISH im Zellkern führen und dies sowohl bei allogenen, als auch bei isogenen Transplantationen. Bei der ISH wurde das Y-Chromosom männlicher Zellen mit einer Digoxigenin markierten Sonde und einem polyklonalen Antikörper gegen Digoxigenin markiert³³. Alveolarmakrophagen wurden danach mit dem monoklonalen Antikörper ED1 nachgewiesen. Bei diesem Weg des Nachweises zeigte sich, dass am Tag 4 nach der Transplantation in der allogenen Gruppe im Median noch 55,7% der Alveolarmakrophagen vom Spender stammen. Bei den isogen transplantierten Tieren

betrug der Wert 72,7%. Somit ist die erste der drei Hypothesen aus der Zielsetzung dieser Arbeit nachgewiesen

Die leichte Diskrepanz der Ergebnisse ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass jeweils unterschiedliche Alveolarmakrophagenpopulationen untersucht wurden: Während bei dem Nachweis des Y-Chromosoms mittels ISH potentiell alle Alveolarmakrophagen erfasst werden, bezieht sich die Auswertung mittels der monoklonalen Antikörper OX6 und OX76 nur auf die Subpopulation der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen.

Auffallend ist, dass am vierten Tag nach der Transplantation noch 55,7% aller Alveolarmakrophagen vom Spender herrühren, während am gleichen Tag nur noch 23,6% der MHC Klasse II positiven Alveolarmakrophagen vom Spender stammen. Dies scheint darauf hinzudeuten, dass der Expression des MHC Klasse II-Moleküls der Alveolarmakrophagen von Spender und Empfänger unterschiedliche Zeitverläufe zu Grunde liegen. Eine Ursache könnte in den unterschiedlichen Aktivierungswegen der Makrophagen liegen. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben zeigen die über die T₁-Helferzellen und Interferon- γ klassisch aktivierten Makrophagen eine deutlich erhöhte Expression des MHC Klasse II-Moleküls⁵². Sie wirken proinflammatorisch und mikrobiozid und verursachen durch die gesteigerte Produktion von Sauerstoffradikalen und Stickstoffmonoxid eine Gewebsschädigung^{1,8,10,52,58}. Die alternativ über die T₂-Helferzellen sowie Interleukin 4 und 13 aktivierten Makrophagen exprimieren vermehrt den Mannose-Rezeptor und wirken immunregulatorisch und entzündungshemmend. Sie begrenzen die Gewebsschädigung und wirken regenerativ^{51,52,92,124}. Möglicherweise sind es die eingewanderten Empfängermakrophagen, die im allogenen Gewebe eine klassische und damit aggressive Aktivierung erfahren, wohingegen die mit transplantierten Alveolarmakrophagen des Spenders eher alternativ oder gar nicht aktiviert sein könnten und entsprechend kein MHC Klasse II exprimieren. Es könnte jedoch auch sein, dass die MHC Klasse II-positiven Makrophagen des Spenders bevorzugt zerstört werden. So wäre der höhere Anteil an MHC Klasse II-positiven Zellen bei den Empfängermakrophagen zu erklären. Diese Hypothesen zu beweisen, sind jedoch weitere Studien erforderlich.

4.2 Proliferation von Alveolarmakrophagen und interstitiellen Makrophagen

Wie unsere Arbeitsgruppe bereits nachgewiesen hat, steigt der Flächenanteil der ED1-positiven Zellen bei der Lungentransplantation in der allogenen DA auf LEW in den ersten Tagen nach der Transplantation von 1% auf über 13%¹¹⁶. Wäre ein solch rapider Anstieg allein auf die Differenzierung und Migration von Empfängermonozyten aus der Blutbahn zurückzuführen, müsste der prozentuale Anteil der Spenderalveolarmakrophagen an der Population verschwindend gering sein. Da diese jedoch auch am vierten Tag nach der Transplantation etwa ein Viertel der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen und etwa die Hälfte aller Alveolarmakrophagen ausmachen, muss ein erheblicher Anteil der neuen Alveolarmakrophagen durch Proliferation vor Ort oder durch Proliferation vom Spender stammender interstitieller Makrophagen entstanden sein.

Die Frage nach dem Mechanismus der Alveolarmakrophagenregeneration wird in der Literatur kontrovers diskutiert.

Klassischerweise wird davon ausgegangen, dass hierfür allein die Rekrutierung und Differenzierung von Monozyten und von interstitiellen Makrophagen verantwortlich ist. So schreibt Bowden¹² die Erneuerung der Alveolarmakrophagen in erster Linie der Migration und Differenzierung von Monozyten aus den Kapillaren zu und in deutlich geringerem Umfang der Teilung und Migration von interstitiellen Makrophagen. Eine nennenswerte Proliferation von Alveolarmakrophagen selbst wird verneint. Lohmann-Matthes et al.⁹⁰ kommen zu ähnlichen Schlussfolgerungen. Maus et al.⁹⁶ bestrahlten CD45.2-positive Mäuse, transplantierten ihnen CD45.1-positives Knochenmark und weisen mittels FACS-Analyse nach Inhalation von E. coli-Endotoxin einen raschen Wechsel der Alveolarmakrophagenherkunft vom Empfängertyp zum Spendertyp in der BALF nach. Daraus schließen auch sie, dass die Alveolarmakrophagenvermehrung ausschließlich durch die Rekrutierung und Differenzierung von Monozyten erfolgt.

Dieses Dogma wird von Autoren angezweifelt, die in Studien Hinweise für die Proliferation von Alveolarmakrophagen in situ nachwiesen. Bitterman et al.⁶ führten bei gesunden Nichtrauchern und Rauchern sowie bei Patienten mit unterschiedlichen Lungenerkrankungen BALs durch und separierten die Alveolarmakrophagen. Die Zellen

wurden dann in vitro mit [³H]Thymidin 16 h inkubiert. Es wurde mittels Autoradiographie bei gesunden Nichtrauchern eine DNA-Synthese bei 0,5% der Alveolarmakrophagen nachgewiesen. Bei Rauchern stieg der Wert auf das Vierfache, bei inflammatorischen Erkrankungen auf das zehn- bis fünfzehnfache. Nakata et al.¹⁰² führte bei Patienten, welche sich aufgrund unterschiedlicher Vorerkrankungen einer Knochenmarktransplantation unterzogen hatten, sowie bei gesunden Nichtrauchern BALs durch. Die Transplantierten standen unter Cyclosporin A-Therapie, Zytokine wurden nicht verabreicht. Bei den aus der BALF separierten Alveolarmakrophagen wurde mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen das *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) die Zellen in Proliferation nachgewiesen. Der Anteil betrug im Mittel 3,0% bei den gesunden Nichtrauchern, 7,1% in der frühen Phase nach Transplantation und 18,3% nach dem 50. Tag. Beide zeigten damit einen erheblichen Anteil proliferierender Alveolarmakrophagen im Menschen.

Schließlich gehen einige Autoren so weit, die Erneuerung der Alveolarmakrophagen ausschließlich auf eine Proliferation in situ zurückzuführen. Sawyer¹¹⁵ erzeugte durch die Injektion des Isotops ⁸⁹Strontium in Mäuse eine schwere Monozytopenie für einen Monat. In dieser Zeit blieb die Population der Alveolarmakrophagen konstant. Er separierte Alveolarmakrophagen aus der BALF der Tiere, bei denen er 30 min zuvor [³H]Thymidin injiziert hatte. Hieraus bestimmte er mittels Autoradiographie, dass sich unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Monozyten etwa 2,0% der Alveolarmakrophagen in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Er errechnete zudem eine Verdopplung der Halbwertszeit der Alveolarmakrophagen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Aus diesen Ergebnissen schloss er, dass sich die Alveolarmakrophagen durch Proliferation erneuern. Den gleichen Schluss ziehen Tarling et al.¹²⁷. An männlichen CBA/J- und CBA/T6-Mäusen, welche einen gut zu unterscheidenden Karyotyp aufweisen, wurden nach fraktionierter Bestrahlung mit 3 x 1 Gy täglich über vier Tage Knochenmarktransplantationen durchgeführt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten bis zu 45 Wochen nach der Transplantation wurden die Tiere getötet und Knochenmarkzellen aus dem Femur sowie Alveolarmakrophagen gewonnen. Es konnten einige Alveolarmakrophagen in Mitose nachgewiesen werden, und während bereits nach zwei Wochen nach Bestrahlung der Anteil der Empfängerzellen im Knochenmark bei der Karyotypisierung unter 10% im Median sank, blieb der Anteil Empfänger-alveolarmakrophagen konstant hoch bis zu 60% nach 45 Wochen. Da laut

Literatur^{23,50,136} die Zeit für eine vollständige Erneuerung des Alveolarmakrophagenpools bei 10 bis 40 Wochen liegt, folgern die Autoren, dass die Alveolarmakrophagen zu einer Selbsterneuerung mittels Proliferation fähig sind.

In allen genannten Studien, egal ob am Menschen oder am Tier, sind die Alveolarmakrophagen über BAL gewonnen worden und stammen von gesunden, knochenmarktransplantierten oder inflammatorisch erkrankten Individuen. Studien bezüglich der Alveolarmakrophagenproliferation im Rahmen der Lungentransplantation und an Zellen *in vivo* waren nicht zu finden.

BrdU ist ein Thymidinanalogon, welches in der Synthesephase (S-Phase) des Zellzyklus an Stelle von Thymidin in die DNA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* inkorporiert wird⁴². Es lässt sich immunhistochemisch nachweisen^{56,100}. Durch intravenöse Pulsmarkierung mit BrdU 30 min vor Entnahme der allo- und isogenen Transplantate konnten wir den Anteil der DNA-synthetisierenden Alveolarmakrophagen bestimmen.

Bei den nicht transplantierten Kontrolltieren fanden wir Werte von ca. 5%. Diese Daten liegen deutlich über den Werten, die Bittermann et al.⁶ für humane, gesunde Nichtraucher ermittelt hatten. Sie entsprechen eher denen von Rauchern und Patienten mit interstitiellen Lungenerkrankungen. Sawyer¹¹⁵ ermittelte etwas niedrigere Werte bei monozytopenen Mäusen und Nakata et al.¹⁰² bei unbehandelten Mäusen. Im Rahmen unserer Studie konnten wir bei den nativen, rechten Lungen der linksseitig isogen oder allogenen transplantierten Ratten einen Prozentsatz von ca. 8% feststellen. In den linken Lungentransplantaten stiegen die Werte auf ca. 17% an. Ähnlich hohe Werte beschreiben Nakata et al.¹⁰² bei Mäusen nach Knochenmarktransplantation.

Zwischen isogenen und allogenen Transplantaten bestand erstaunlicherweise kein Unterschied, der Unterschied zwischen nichttransplantierten Kontrolllungen und Lungentransplantaten war jedoch signifikant. Die Anteile proliferierender Alveolarmakrophagen in den transplantierten, linken Lungen waren mehr als doppelt so hoch wie die in den nicht transplantierten, rechten Lungen. Dies zeigt nicht nur die in erheblichem Umfang stattfindende Proliferation der Alveolarmakrophagen im Lungentransplantat, sondern weist auch darauf hin, dass die Transplantation selbst und nicht die Abstoßung der hierzu führende Stimulus zu sein scheint. Dies steht in Kontrast

zu den Ergebnissen bei Nierentransplantationen in der Ratte, bei denen der Anteil der proliferierenden Makrophagen im allogenen Transplantat etwa viermal so hoch ist wie im isogenen⁵⁷. Hierdurch ist auch die zweite der Eingangshypothesen nachgewiesen, die dritte jedoch widerlegt.

Die Rolle der interstitiellen Makrophagen für die Erneuerung der Alveolarmakrophagen wird zwar in vielen der oben genannten Veröffentlichungen akzeptiert, eine Quantifizierung fehlt jedoch. Dies mag vor allem daran liegen, dass die peribronchialen und perivaskulären Lungenmakrophagen im Gegensatz zu den Alveolarmakrophagen nicht mittels BAL zu gewinnen sind.

Um die Proliferation der interstitiellen Makrophagen zu analysieren, führten wir immunhistochemische Untersuchungen mit dem monoklonalen Antikörper Bu20a zusätzlich in Kombination mit dem monoklonalen Antikörper ED2 durch. Während bei den nicht transplantierten Kontrolltieren und den rechten, nativen Lungen der Transplantatempfänger keine DNA-Synthese nachweisbar war, waren ca. 7% der interstitiellen Makrophagen im isogenen Lungentransplantat und ca. 10% im allogenen Lungentransplantat in der S-Phase des Zellzyklus.

Dies stützt die These, dass die Vermehrung der Alveolarmakrophagen zu einem gewissen Teil auf die Proliferation und Migration von residenten, peribronchialen und perivaskulären Lungenmakrophagen zurückzuführen sein kann.

5 Zusammenfassung

5.1 Herkunft und Proliferation von Alveolarmakrophagen nach Lungentransplantation in der Ratte

Die Alveolarmakrophagen spielen eine wichtige Rolle bei der akuten Abstoßung von Lungentransplantaten. Beim Menschen ist ein persistierender Chimärismus in einigen Studien über Untersuchungen an bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit und transbronchialen Biopsien nachgewiesen. Studien, die die Herkunft der Alveolarmakrophagen nach allogener Lungentransplantation in der Ratte in den Alveolen beschreiben, fehlen jedoch. Desweiteren findet sich bereits in der frühen Phase der Abstoßung ein starker Anstieg der Makrophagenanzahl im Infiltrat. Ursächlich hierfür könnte zum einen eine verstärkte Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut oder die Proliferation und Differenzierung von interstitiellen Makrophagen sein. Zum anderen kommen eine verminderte Elimination aus dem Alveolarraum und den Atemwegen oder eine Proliferation der Makrophagen in den Alveolen in Frage. In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir die Herkunft und das Proliferationsverhalten von Alveolarmakrophagen im Lungentransplantat der Ratte.

Es wurden orthotope, linksseitige Lungentransplantationen in der isogenen LEW auf LEW und der allogenen DA auf LEW Rattenstammkombination durchgeführt. Um die Makrophagenherkunft über das Y-Chromosom zu klären, wurden zusätzlich die Lungen weiblicher Spender auf männliche Empfänger transplantiert. Zunächst bestimmten wir den Anteil der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen über eine immunhistochemische Doppelfärbung mit den monoklonalen Antikörpern ED1 und OX6. Es zeigte sich, dass an Tag drei und vier nach Transplantation etwa ein Viertel der Alveolarmakrophagen MHC Klasse II exprimierten. Im Weiteren stellten wir mittels Doppelfärbung mit den monoklonalen Antikörpern ED1 und OX76 den Anteil der MHC Klasse II-Positiven Alveolarmakrophagen vom Spendertyp fest. Dieser lag bei etwa 10% an Tag drei und 7% an Tag vier. Hieraus berechneten wir, dass am dritten Tag nach der Transplantation 40% und am vierten Tag 24% der MHC Klasse II-positiven Alveolarmakrophagen vom Transplantatspender stammen. Mit Transplantationen von weiblichen Spenderorganen auf männliche Empfänger konnten wir über die Bestimmung

des Y-Chromosoms mittels ISH und Färbung mit dem monoklonalen Antikörper ED1 feststellen, dass am vierten Tag nach der Transplantation 55% der Alveolarmakrophagen in der allogenen transplantierten Lunge vom Spender stammen. Im isogenen Transplantat betrug der Wert 73%.

Um die Zellen zu detektieren, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, injizierten wir den Tieren 30 min vor der Tötung am zweiten Tag nach der Transplantation BrdU. Der Einbau von BrdU bei der DNA-Synthese wurde für die Alveolarmakrophagen mittels Doppelfärbung mit den monoklonalen Antikörpern ED1 und Bu20a und für die interstitiellen Makrophagen mittels Doppelfärbung mit den monoklonalen Antikörpern ED2 und Bu20a sichtbar gemacht. So zeigte sich, dass etwa 5% der Alveolarmakrophagen nicht transplantierte Tiere DNA synthetisieren. Bei den transplantierten Tieren befanden sich bis zu 21% der Alveolarmakrophagen in DNA-Synthese, unabhängig ob allogene oder isogen transplantiert wurde. Für die interstitiellen Makrophagen betrug der Wert 10%.

Wir konnten nachweisen, dass bei den Alveolarmakrophagen im allogenen Lungentransplantat der Ratte ein anhaltender Chimärismus besteht. Darüber hinaus zeigten wir, dass die Transplantation bei den Alveolarmakrophagen verstärkt Proliferation induziert. Dies trifft ebenso, wenn auch in geringerem Maße für die interstitiellen Makrophagen zu. Vergleichbar hohe Proliferationsraten sind bislang nicht beschrieben worden. Es ist daher davon auszugehen, dass die Proliferation wesentlich zur Vermehrung der Alveolarmakrophagen beiträgt, welche nach der isogenen und allogenen Lungentransplantation zu beobachten ist.

5.2 Origin and proliferation of alveolar macrophages after lung transplantation in the rat

Alveolar macrophages are involved in acute lung allograft rejection. After lung transplantation in humans, chimerism is shown in some studies investigating bronchoalveolar lavage fluid or transbronchial biopsies. Studies investigating the origin of alveolar macrophages in rat lung allografts, however, are missing. Early after allogeneic transplantation, the population of alveolar macrophages increases in number. This might be due to an increased recruitment of blood monocytes, proliferation and migration of peribronchial and perivascular macrophages, to slowing down their elimination from the airways or to proliferation of the alveolar macrophages in situ. It is not known, if proliferation in situ can significantly contribute to the regeneration or enlargement of the pool of alveolar macrophages. In this study, we investigated the origin and proliferation of alveolar macrophages after lung transplantation in the rat.

Orthotopic transplantation of the left lung was performed in the isogeneic LEW to LEW and in the allogeneic DA to LEW rat strain combination. To investigate the origin of alveolar macrophages by the detection of the y-chromosome, isogeneic and allogeneic transplantations were performed using female donors and male recipients.

First, we determined the proportion of alveolar macrophages in pulmonary allografts expressing MHC class II antigens in double-staining experiments with ED1 and OX6. On day 3 and 4, about 25% of the alveolar macrophages expressed MHC class II. Subsequently, double-staining experiments using monoclonal antibodies ED1 and OX76 were performed. Approximately 10% of the alveolar macrophages on day 3 and 7% on day 4 expressed donor type MHC class II. We concluded that 40% of all alveolar macrophages on day 3 and 24% on day 4 were of donor origin. After sex-mismatched transplantations, we investigated the origin of the alveolar macrophages by detection of the y-chromosome by in situ hybridization and staining with monoclonal antibody ED1. We demonstrate that in lung allografts 56% of the alveolar macrophages are still of donor origin on day 4. After isogeneic transplantation 73% donor alveolar macrophages are detected.

To label cell nuclei in the S-phase of the cell cycle, BrdU was injected on day 2 post transplantation 30 min before sacrificing the animals. Alveolar macrophages in the S-

phase were detected using monoclonal antibodies ED1 and Bu20a, peribronchial and perivascular macrophages synthesizing DNA were identified with monoclonal antibodies ED2 and Bu20a. Whereas the incorporation of BrdU into the nuclei of alveolar macrophages in untreated control lungs was nearly 5%, on the second day after experimental lung transplantation, up to 21% of the alveolar macrophages displayed cell nuclei positive for BrdU, indicating that they synthesized DNA. No differences in the frequency of BrdU-positive macrophages were obvious between isografts and allografts. About 10% of the peribronchial and perivascular macrophages incorporated BrdU.

We demonstrate that there is a lingering chimerism of alveolar macrophages in lung allografts. Furthermore we show that transplantation strongly induces proliferation of alveolar macrophages in the alveoli of the graft. This holds also true for peribronchial and perivascular macrophages, which proliferate but exhibit a slightly lower proliferative index. We are the first to describe high local proliferation rates of alveolar macrophages. Mitotic proliferation considerably contributes to the increase in the number of alveolar macrophages observed after isogeneic or allogeneic lung transplantation.

6 Liste der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BOS	Bronchiolitis obliterans Syndrom
BrdU	5-Brom-2'-Desoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cm	Zentimeter
cm H ₂ O	Zentimeter Wassersäule
CMV	Zytomegalievirus
COPD	<i>chronic obstructive pulmonary disease</i> /chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DA	Dark Agouti
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DLT	<i>double lung transplantation</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	deionisiertes Formamid
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen/Einsekundenkapazität
HLT	<i>combined heart and lung transplantation</i>
h	Stunde(n)
HCl	Salzsäure
ISH	In-situ-Hybridisierung
ISHLT	<i>International Society for Heart and Lung Transplantation</i>
LEW	Lewis
MEF ₂₅₋₇₅	maximaler expiratorischer Fluss bei 25/50/75% der forcierten Vitalkapazität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
µl	Mikroliter

µm	Mikrometer
min	Minute(n)
mm	Millimeter
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
SLT	<i>single lung transplantation</i>
SSC	<i>standard-saline-citrate-Puffer</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
VE	voll entmineralisiert

7 Literaturverzeichnis

- ¹ Al-Mehdi, A. B., Shuman, H., Fisher, A. B. (1997) Intracellular generation of reactive oxygen species during nonhypoxic lung ischemia. *Am. J. Physiol.* 272, 294-300.
- ² Bando, K., Paradis, I. L., Similo, S., et al. (1995) Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation: an analysis of risk factors and management. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 110, 4–13.
- ³ Barnes, P. J. (2004) Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD.* 1(1), 59-70.
- ⁴ Barnes, P. J. (2004) Alveolar macrophages in chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Cell. Mol. Biol.* 50, OL627–OL637.
- ⁵ Becker, F. S., Martinez, F. J., Brunsting, L. A., Deeb, G. M., Flint, A., Lynch, J. P. III. (1994) Limitations of spirometry in detecting rejection after single-lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 150, 159–166.
- ⁶ Bitterman, P. B., Saltzman, L. E., Adelberg, S., Ferrans, V. J., Crystal, R. G. (1984) Alveolar macrophage replication. One mechanism for the expansion of the mononuclear phagocyte population in the chronically inflamed lung. *J. Clin. Invest.* 74, 460–469.
- ⁷ Bittmann, I., Dose, T., Baretton, G. B., Müller, C., Schwaiblmair, M., Kur, F., Löhrs, U. (2001) Cellular Chimerism of the Lung After Transplantation. *Am. J. Clin. Pathol.* 115, 525-533.
- ⁸ Blöcher S., Wilker S., Sucke J., Pfeil U., Dietrich H., Weimer R., Steger, K., Kaufmann, A., Hirschburger, M., Plötz, C., Padberg, W., Grau, V. (2007) Acute rejection of experimental lung allografts: characterization of intravascular mononuclear leukocytes. *Clin. Immunol.* 124, 98-108.
- ⁹ Blondeau, K., Mertens, V., Vanaudenaerde, B. A., Verleden, G. M., Van Raemdonck, D. E., Sifrim, D., Dupont, L. J. (2008) Gastro-oesophageal reflux and gastric aspiration in lung transplant patients with or without chronic rejection. *Eur. Respir. J.* 31, 707–713.
- ¹⁰ Bogdan, C., Rollinghoff, M., Diefenbach, A. (2000) Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 12, 64-76.
- ¹¹ Botha, P., Archer, L., Anderson, R. L., Lordan, J., Dark, J. H., Corris, P. A., Gould, K., Fisher, A. J. (2008) *Pseudomonas aeruginosa* colonization of the allograft after lung transplantation and the risk of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation.* 85, 771–774.
- ¹² Bowden, D. H. (1984) The alveolar macrophage. *Environ Health Perspect.* 55, 327-341.
- ¹³ Bromley M., Rew, D., Becciolini, A., Balzi, M., Chadwick, C., Hewitt, D. (1996) A comparison of proliferation markers (BrdUrd, Ki-67, PCNA) determined at each cell position in the crypts of normal human colonic mucosa. *Eur. J. Histochem.* 40, 89-100.

- 14 Burke, C. M., Theodore, J., Dawkins, K. D., et al. (1984) Post-transplant obliterative bronchiolitis and other late lung sequelae in human heart-lung transplantation. *Chest*. 86, 824–829.
- 15 Burton, C. M., Carlsen, J., Mortensen, J., Andersen, C. B., Milman, N., Iversen, M. (2007) Long-term survival after lung transplantation depends on development and severity of bronchiolitis obliterans syndrome. *J. Heart. Lung. Transplant*. 26, 681–686.
- 16 Burton, C.M., Milman, N., Carlsen, J., Arendrup, H., Eliassen, K., Andersen, C.B., Iversen, M. (2005) The Copenhagen National Lung Transplant Group: survival after single lung, double lung, and heart-lung transplantation. *J. Heart. Lung. Transplant*. 24(11), 1834-1843.
- 17 Cahill, B. C., Hibbs, J. R., Savik, K, et al. (1997) Aspergillus airway colonization and invasive disease after lung transplantation. *Chest*. 112, 1160–1164.
- 18 Cantu, E. III, Appel, J. Z. III, Hartwig, M. G., Woreta, H., Green, C., Messier, R., Palmer, S. M., Davis, R. D. Jr. (2004) J. Maxwell chamberlain memorial paper. Early fundoplication prevents chronic allograft dysfunction in patients with gastroesophageal reflux disease. *Ann. Thorac. Surg*. 78, 1142–1151.
- 19 Cecka, J.M. (2001) The UNOS renal transplant registry. *Clin. Transpl*. 1-18.
- 20 Chan, K. M., Allen, S. A. (2002) Infectious pulmonary complications in lung transplant recipients. *Semin. Respir. Infect*. 17, 291–302
- 21 Christie, J. D., Bavaria, J. E., Palevsky, H. I., Litzky, L., Blumenthal, N. P., Kaiser, L. R., Kotloff, R. M. (1998) Primary graft failure following lung transplantation. *Chest* 114(1), 51-60.
- 22 Cisneros, J. M , Munoz, P., Torre-Cisneros, J., et al (1998) Spanish Transplantation Infection Study Group. Pneumonia after heart transplantation: a multi-institutional study. *Clin. Infect. Dis*. 27, 324–331
- 23 Coggle, J. E., Tarling, J. D. (1982) Cell kinetics of pulmonary alveolar macrophages in the mouse. *Cell. Tissue. Kinet*. 15(2), 139-143.
- 24 Cooke, K. R., Yanik, G. (2004) Acute injury after allogeneic stem cell transplantation: is the lung a target of acute graft-versus-host disease? *Bone Marrow Transplant*. 34, 753–765.
- 25 Crowell, R. E., Heaphy, E., Valdez, Y., Mold, C., Lehnert, B. E. (1992) Alveolar and interstitial macrophages in the murine lung. *Exp. Lung. Res*. 18, 435–446.
- 26 D'Ovidio, F., Mura, M., Tsang, M., Waddell, T. K., Hutcheon, M. A., Singer, G., Hadjiliadis, D., Chaparro, C., Gutierrez, C., Pierre, A., et al. (2005) Bile acid aspiration and the development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg*. 129, 1144–1152.
- 27 Daud, S. A., Yusen, R. D., Meyers, B. F., Chakinala, M. M., Walter, M. J., Aloush, A. A., Patterson, G. A., Trulock, E. P., Hachem, R. R. (2007) Impact of immediate primary lung allograft dysfunction on bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. 175, 507–513.

- ²⁸ de Perrot, M., Chaparro, C., McRae, K., Waddell, T.K., Hadjiliadis, D., Singer, L.G., Pierre, A.F., Hutcheon, M., Keshavjee, S. (2004) Twenty-year experience of lung transplantation at a single center: Influence of recipient diagnosis on long-term survival. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg* 127(5), 1493-1501.
- ²⁹ de Perrot, M., Liu, M., Waddell, T. K., Keshavjee, S. (2003) Ischemiareperfusion-induced lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 167, 490–511.
- ³⁰ De Vito Dabbs, A., Hoffman, L. A., Iacono, A. T., Zullo, T. G., McCurry, K. R., Dauber, J. H. (2004) Are symptom reports useful for differentiating between acute rejection and pulmonary infection after lung transplantation? *Heart. Lung.* 33, 372–380.
- ³¹ De Vito Dabbs, A., Hoffman, L. A., Iacono, A. T., et al. (2003) Pattern and predictors of early rejection after lung transplantation. *Am. J. Crit. Care.* 12, 497–507
- ³² Dijkstra, C. D., Döpp, E. A., Joling, P., Kraal, G. (1985) The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology* 54, 589–599.
- ³³ Essers, J., de Stoppelaar, J. M., Hoebee, B. (1995) A new rat repetitive DNA family shows preferential localization on chromosome 3, 12 and Y after fluorescence in situ hybridization and contains a subfamily which is Y chromosome specific. *Cytogenet. Cell Genet.* 69, 246–252.
- ³⁴ Estenne, M., Hertz, M. I. (2002) Bronchiolitis obliterans after human lung transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 166, 440–444.
- ³⁵ Estenne, M., Maurer, J. R., Bohler, A., et al. (2002) Bronchiolitis obliterans syndrome 2001: An update of the diagnostic criteria. *J. Heart. Lung. Transplant.* 21, 297–310.
- ³⁶ Fischer, S., Struber, M., Haverich, A., (2002) Current status of lung transplantation: patients, indications, techniques and outcome. *Med. Klin.* 97(3), 137-143.
- ³⁷ Fiser, S. M., Tribble, C. G., Long, S. M., Kaza, A. K., Cope, J. T., Laubach, V. E., Kern, J. A., Kron, I. L. (2001) Lung transplant reperfusion injury involves pulmonary macrophages and circulating leukocytes in a biphasic response. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 121, 1069–1075.
- ³⁸ Fiser, S. M., Tribble, C. G., Long, S. M., Kaza, A. K., Kern, J. A., Jones, D. R., Robbins, M. K., Kron, I. L. (2002) Ischemia-reperfusion injury after lung transplantation increases risk of late bronchiolitis obliterans syndrome. *Ann. Thorac. Surg.* 73(4), 1041-1048.
- ³⁹ Fishman, J. A., Rubin, R. H. (1998) Infection in organ transplant recipients. *N. Engl. J. Med.* 338, 1741–1751
- ⁴⁰ Franke, U., Wiebe, K., Harringer, W., Franke, T., Wittwer, T., Wahlers, T., Haverich, A. (2000) Ten years experience with lung and heart-lung transplantation in primary and secondary pulmonary hypertension. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 18(4), 447-452.

- 41 Fritsch, P., Masse, R. (1992) Overview of pulmonary alveolar macrophage renewal in normal rats and during different pathological processes. *Environ. Health. Perspect.* 97, 59-67.
- 42 Gage, F. H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.
- 43 Gammie, J. S., Stukus, D. R., Pham, S. M., Hattler, B. G., McGrath, M. F., McCurry, K. R., Griffith, B. P., Keenan, R. J. (1999) Effect of ischemic time on survival in clinical lung transplantation. *Ann. Thorac. Surg.* 68(6), 2015-9; discussion 2019-2020.
- 44 Gartner, J. G., Adamson, I. Y., Bowden, D. H. (1988) Proliferation of pulmonary macrophages during the early phase of an acute graft-versus-host reaction in mice. *Exp. Lung. Res.* 14(6), 781-796.
- 45 Gaspert, A., Boehler, A., Weder, W., Speich, R., Vogt, P. (2000) Special problems after lung transplantation: walking a tightrope between infection and graft rejection. *Schweiz. Med. Wochenschr.* 130(25), 944-951.
- 46 Girgis, R. E., Tu, I., Berry, G. J., et al. (1996) Risk factors for the development of obliterative bronchiolitis after lung transplantation. *J. Heart. Lung. Transplant.* 15, 1200–1208.
- 47 Girnita, A. L., Duquesnoy, R., Yousem, S. A., Iacono, A. T., Corcoran, T. E., Buzoianu, M., Johnson, B., Spichty, K. J., Dauber, J. H., Burckart, G., et al. (2005) HLA-specific antibodies are risk factors for lymphocytic bronchiolitis and chronic lung allograft dysfunction. *Am. J. Transplant.* 5, 131–138.
- 48 Girnita, A. L., McCurry, K. R., Iacono, A. T., Duquesnoy, R., Corcoran, T. E., Awad, M., Spichty, K. J., Yousem, S. A., Burckart, G., Dauber, J. H., et al. (2004) HLA-specific antibodies are associated with high-grade and persistent recurrent lung allograft acute rejection. *J. Heart. Lung. Transplant.* 23, 1135–1141.
- 49 Glanville, A. R., Gencay, M., Tamm, M., et al. (2005) Chlamydia pneumoniae infection after lung transplantation. *J. Heart. Lung. Transplant.* 24, 131–136.
- 50 Godleski, J. J., Brain, J. D. (1972) The origin of alveolar macrophages in mouse radiation chimeras. *J. Exp. Med.* 136(3), 630-643.
- 51 Gordon, S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 23-35.
- 52 Gordon, S., Taylor, P. R. (2005) Monozyte and macrophage heterogeneity *Nat. Rev. Immunol.* 5(12), 953-964.
- 53 Gottlieb, J. (2008) Update on lung transplantation. *Ther. Adv. Respir. Dis.* 2(4), 237-247.
- 54 Gotway, M. B., Dawn, S. K., Sellami, D., Golden, J. A., Reddy, G. P., Keith, F. M., Webb, W. R. (2001) Acute rejection following lung transplantation: limitations in accuracy of thin-section CT for diagnosis. *Radiology.* 221, 207–212.
- 55 Gratchev, A., Guillot, P., Hakiy, N., Politz, O., Orfanos, C., E., Schledzewski, K., Goerdts, S. (2001) Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scand. J. Immunol.* 53, 386-392.
- 56 Gratzner, H. G. (1982) Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine: New reagent for detection of DNA replication. *Science* 218, 474-475.

- ⁵⁷ Grau, V., Herbst, B., Steiniger, B. (1998) Dynamics of monocytes/macrophages and T lymphocytes in acutely rejecting rat renal allografts. *Cell. Tissue Res.* 291(1), 117-126.
- ⁵⁸ Grau, V., Stehling, O., Garn, H., Steiniger, B. (2001) Accumulating monocytes in the vasculature of rat renal allografts: Phenotype, cytokine, inducible NO-synthase, and tissue factor mRNA expression. *Transplantation* 71, 37-46.
- ⁵⁹ Grover, F. L., Fullerton, D. A., Zamora, M. R., Mills, C., Ackerman, B., Badesch, D., Brown, J. M., Campbell, D. N., Chetham, P., Dhaliwal, A., Diercks, M., Kinnard, T., Niejadlik, K., Ochs, M. (1997) The past, present and future of lung transplantation. *Am. J. Surg.* 173(6), 523-533.
- ⁶⁰ Hachem, R. R., Khalifah, A. P., Chakinala, M. M., et al. (2005) The significance of a single episode of minimal acute rejection after lung transplantation. *Transplantation*. 80, 1406–1413.
- ⁶¹ Harringer, W., Wiebe, K., Strüber, M., Franke, U., Niedermeyer, J., Fabel, H., Haverich, A. (1999) Lung transplantation – 10-year experience. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 16(5), 546-554.
- ⁶² Hartwig, M. G., Appel, J. Z., Davis, R. D. (2005) Antireflux surgery in the setting of lung transplantation: strategies for treating gastroesophageal reflux disease in a high-risk population. *Thorac. Surg. Clin.* 15, 417–427.
- ⁶³ Heng, D., Sharples, L. D., McNeil, K., Stewart, S., Wreghitt, T., Wallwork, J. (1998) Bronchiolitis obliterans syndrome: incidence, natural history, prognosis, and risk factors. *J. Heart. Lung. Transplant.* 17, 1255–1263.
- ⁶⁴ Herve, P., Silbert, D., Cerrina, J., Simonneau, G., Dartevelle, P. (1993) Impairment of bronchial mucociliary clearance in long-term survivors of heart/lung and double-lung transplantation. The Paris-Sud Lung Transplant Group. *Chest.* 103 (1), 59-63
- ⁶⁵ Hocking, W. G., Golde, D. W. (1979) The pulmonary-alveolar macrophage (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 301(11), 580.
- ⁶⁶ Hocking, W. G., Golde, D. W. (1979) The pulmonary-alveolar macrophage (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* 301(12), 639.
- ⁶⁷ Holt, P. G., Oliver, J., Bilyk, N., McMenamin, C., McMenamin, P. G., Kraal, G., Thepen, T. (1993) Downregulation of the antigen presenting cell function(s) of pulmonary dendritic cells in vivo by resident alveolar macrophages. *J. Exp. Med.* 177, 397–407.
- ⁶⁸ Hopkins, P. M., Aboyou, C. L., Chhajed, P. N., et al. (2004) Association of minimal rejection in lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 170, 1022–1026.
- ⁶⁹ Husain, A. N., Siddiqui, M. T., Holmes, E. W., et al. (1999) Analysis of risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 159, 829–833.
- ⁷⁰ Johnsson, S., Musher, D. M., Goree, A., Lawrence, E. C. (1986) Human alveolar lining material and antibacterial defense. *Am. Rev. Respir. Dis.* 133, 136–142.

- 71 Kaplan, J. D., Trulock, E. P., Cooper, J. D., Schuster, D. P. (1992) Pulmonary vascular permeability after lung transplantation. A positron emission tomographic study. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145(4 Pt 1), 954-957.
- 72 Keenan, R. J., Zeevi, A., Banas, E. et al. (1994) Microchimerism is associated with a lower incidence of chronic rejection after lung transplantation. *J. Heart. Lung. Transplant.* 13, 32.
- 73 Keogh, A., Kaan, A., Doran, T., Macdonald, P., Bryant, D., Spratt, P. (1995) HLA mismatching and outcome in heart, heart-lung and single lung transplantation. *J. Heart. Lung. Transplant.* 14, 444-451.
- 74 Khalifah, A. P., Hachem, R. R., Chakinala, M. M., et al. (2005) Minimal acute rejection after lung transplantation: a risk for bronchiolitis obliterans syndrome. *Am. J. Transplant.* 5, 2022-2030.
- 75 Khalifah, A. P., Hachem, R. R., Chakinala, M. M., Schechtman, K. B., Patterson, G. A., Schuster, D. P., Mohanakumar, T., Trulock, E. P., Walter, M. J. (2004) Respiratory viral infections are a distinct risk for bronchiolitis obliterans syndrome and death. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 170, 181-187.
- 76 Khan, S. U., Salloum, J., O'Donovan, P. B., Mascha, E. J., Mehta, A. C., Matthay, M. A., Arroliga, A. C. (1999) Acute pulmonary edema after lung transplantation: the pulmonary reimplantation response. *Chest* 116(1), 187-194.
- 77 King, R. C., Binns, O. A., Rodriguez, F., Kanithanon, R. C., Daniel, T. M., Spotnitz, W. D., Tribble, C. G., Kron, I. L. (2000) Reperfusion injury significantly impacts clinical outcome after pulmonary transplantation. *Ann. Thorac. Surg.* 69(6), 1681-1685.
- 78 Kjellström, C., Ichimura, K., Chen, X. J., Riise, G. C., Collins, V. P. (2000) The origin of alveolar macrophages in the transplanted lung: a longitudinal microsatellite-based study of donor and recipient DNA. *Transplantation.* 69(9), 1984-1986.
- 79 Knoop, C., Estenne, M. (2006) Acute and chronic rejection after lung transplantation. *Semin. Respir. Crit. Care. Med.* 27(5), 521-533.
- 80 Kondo, T., Wu, G. D., Saito, R., Marchevsky, A. M., Prehn, J., Matloff, J. M., Waters, P. F., Jordan, S. C. (1993) Immunocytologic analysis of cells obtained from bronchoalveolar lavage in a model of rat lung allograft rejection. *J. Surg. Res.* 55, 351-356.
- 81 Kotloff, R. H., Vivek, N., Crawford, S. W. (2004) Pulmonary complications of solid organ and hematopoietic stem cell transplantation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 170, 22-48
- 82 Kotsimbos, T. C., Snell, G. I., Levvey, B., Spelman, D. W., Fuller, A. J., Wesselingh, S. L., Williams, T. J., Ostergaard, L. (2005) Chlamydia pneumoniae serology in donors and recipients and the risk of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Transplantation.* 79, 269-275.
- 83 Kramer, M. R., Marshall, S. E., Starnes, V. A., Gamberg, P., Amita, Z., Theodore, J. (1993) Infectious complications in heart-lung transplantation: analysis of 200 episodes. *Arch Intern Med.* 153, 2010-2016

- 84 Kroshus, T. J., Kshetry, V. R., Savik, K., John, R., Hertz, M. I., Bolman, R. M., III. (1997) Risk factors for the development of bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 114, 195–202.
- 85 Kubak, B. M. (2002) Fungal infection in lung transplantation. *Transpl. Infect. Dis.* 4(suppl 3), 24–31.
- 86 Kukafka, D. S., O'Brien, G. M., Furukawa, S., Criner, G. J. (1997) Surveillance bronchoscopy in lung transplant recipients. *Chest.* 111, 377–381.
- 87 Kumar, D., Erdman, D., Keshavjee, S., et al. (2005) Clinical impact of community-acquired respiratory viruses on bronchiolitis obliterans after lung transplant. *Am. J. Transplant.* 5, 2031–2036.
- 88 Lama, V. N., Murray, S., Lonigro, R. J., Toews, G. B., Chang, A., Lau, C., Flint, A., Chan, K. M., Martinez, F. J. (2007) Course of FEV1 after onset of bronchiolitis obliterans syndrome in lung transplant recipients. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 175, 1192–1198.
- 89 Lehnert, B. E., Valdez, Y., Holland, L. (1985) Pulmonary macrophages: alveolar and interstitial populations. *Exp. Lung. Res.* 9, 177–185.
- 90 Lohmann-Matthes, M-L., Steinmüller, C., Franke-Ullmann, G. (1994) Pulmonary macrophages. *Eur. Respir. J.* 7, 1678–1689.
- 91 Mantovani, A., Sica, A., Locati, M. (2007) New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur. J. Immunol.* 37, 14–16.
- 92 Mantovani, A., Sica, A., Sozzoni, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677–686.
- 93 Martinu, T., Howell, D. N., Davis, R. D., Steele, M. P., Palmer, S. M. (2006) Pathologic correlates of bronchiolitis obliterans syndrome in pulmonary retransplant recipients. *Chest.* 129(4), 1016–1023.
- 94 Martinu, T., Howell, D. N., Davis, R. D., Steele, M. P., Palmer, S. M. (2006) Pathologic correlates of bronchiolitis obliterans syndrome in pulmonary transplant recipients. *Chest.* 129, 1016–1023.
- 95 Maurer, J. R., Tullis, E., Grossman, R. F., Velland, H., Winton, T. L., Patterson, G. A. (1992) Infectious complications following isolated Lung transplantation. *Chest.* 101, 1056–1059
- 96 Maus, U.A., Janzen, S., Wall, G., Srivastava, M., Blackwell, T.S., Christman, J.W., Seeger, W., Welte, T., Lohmeyer, J. (2006) Resident alveolar macrophages are replaced by recruited monocytes in response to endotoxin-induced lung inflammation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 35(2), 227–235.
- 97 McMaster, W., R., Williams, A., F. (1979) Identification of Ia glycoproteins in rat thymus and purification from rat spleen. *Eur. J. Immunol.* 9, 426–433.
- 98 McNeil, K., Glanville, A. R., Wahlers, T., et al. (2006) Comparison of mycophenolate mofetil and azathioprine for prevention of bronchiolitis obliterans syndrome in de novo lung transplant recipients. *Transplantation* 81, 998–1003.
- 99 Mizuta, T., Kawaguchi, A., Nakahara, K., Kawashima, Y. (1989) Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 97, 578–581.

- ¹⁰⁰ Muskhelishvili, L., Latendresse, J. R., Kodell, R. L., Henderson, E. B. (2003) Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *J. Histochem. Cytochem.* 51, 1681–1688.
- ¹⁰¹ Naidu, B. V., Krishnadasan, B., Byrne, K., Farr, A. L., Rosengart, M., Verrier, E. D., Mulligan, M. S. (2002) Regulation of chemokine expression by cyclosporine A in alveolar macrophages exposed to hypoxia and reoxygenation. *Ann. Thorac. Surg.* 74, 899-905.
- ¹⁰² Nakata, K., Gotoh, H., Watanabe, J., Uetake, T., Komur, I., Yuasa, K., Watanabe, S., Ieki, R., Sakamaki, H., Akiyama, H., Kudoh, S., Naitoh, M., Satoh, H., Shimada, K. (1999) Augmented proliferation of human alveolar macrophages after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 93, 667–673.
- ¹⁰³ Nathan, S. D., Shlobin, O. A., Ahmad, S., Barnett, S. D., Burton, N. A., Gladwin, M. T., Machado, R. F. (2008) Pulmonary hypertension in patients with bronchiolitis obliterans syndrome listed for retransplantation. *Am. J. Transplant.* 8(7), 1506-1511.
- ¹⁰⁴ Neurohr, C., Huppmann, P., Leuchte, H., Schwaiblmair, M., Bittmann, I., Jaeger, G., Hatz, R., Frey, L., Uberfuhr, P., Reichart, B., et al. (2005) Human herpesvirus 6 in bronchialveolar lavage fluid after lung transplantation: a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome? *Am. J. Transplant.* 5, 2982–2991.
- ¹⁰⁵ Palmer, S. M., Baz, M. A., Sanders, L., et al. (2001) Results of a randomized, prospective, multicenter trial of mycophenolate mofetil versus azathioprine in the prevention of acute lung allograft rejection. *Transplantation* 71, 1772–1776.
- ¹⁰⁶ Palmer, S. M., Davis, R. D., Hadjiliadis, D., Hertz, M. I., Howell, D. N., Ward, F. E., Savik, K., Reinsmoen, N. L. (2002) Development of an antibody specific to major histocompatibility antigens detectable by flow cytometry after lung transplant is associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation.* 74, 799–804.
- ¹⁰⁷ Quantz, M. A., Bennett, L. E., Meyer, D. M., Novick, R. J. (2000) Does human leukocyte antigen matching influence the outcome of lung transplantation? An analysis of 3,549 lung transplantations. *J. Heart. Lung. Transplant.* 19, 473–479.
- ¹⁰⁸ Reinsmoen, N. L., McSherry, C., Jackson, A. J., Hertz, M. I., Bolman, R. M., Matas, A. J. (1995) Circulating donor antigen and response to donor antigen as predictors of long-term lung and kidney transplant success. *Transplant. Proc.* 27(1), 205-206.
- ¹⁰⁹ Reynaud-Gaubert, M., Thomas, P., Gregoire, R., Badier, M., Cau, P., Sampol, J., Giudicelli, R., Fuentes, P. (2002) Clinical utility of bronchoalveolar lavage cell phenotype analyses in the postoperative monitoring of lung transplant recipients. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 21, 60–66.
- ¹¹⁰ Reynolds, H. Y. (1987) Bronchoalveolar lavage (state of art). *Am. Rev. Respir. Dis.* 135, 250–263.
- ¹¹¹ Ross, D. J., Marchevsky, A., Kramer, M., Kass, R. M. (1997) Refractoriness of airflow obstruction associated with isolated lymphocytic bronchiolitis/bronchitis in pulmonary allografts. *J. Heart. Lung. Transplant.* 16, 832–838.

- 112 Rothmeier, C., Roux, E., Spiliopoulos, A., Gerbase, M., Nicod, L. P. (2001) Early chimerism of macrophages and lymphocytes in lung transplant recipients is predictive of graft tolerance. *Transplantation*. 71(9), 1329-1333.
- 113 Ruttman, E., Geltner, C., Bucher, B., et al. (2006) Combined CMV prophylaxis improves outcome and reduces the risk for bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) after lung transplantation. *Transplantation*. 81, 1415–1420.
- 114 Saggar, R., Ross, D. J., Saggar, R., Zisman, D. A., Gregson, A., Lynch, J. P. 3rd, Keane, M. P., Weigt, S. S., Ardehali, A., Kubak, B., Lai, C., Elashoff, D., Fishbein, M. C., Wallace, W. D., Belperio, J. A. (2008) Pulmonary hypertension associated with lung transplantation obliterative bronchiolitis and vascular remodeling of the allograft. *Am. J. Transplant*. 8(9), 1921-1930.
- 115 Sawyer, R. T. (1986) The significance of local resident pulmonary alveolar macrophage proliferation to population renewal. *J. Leukoc. Biol.* 39, 77–87.
- 116 Schmidt, A., Sucke, J., Fuchs-Moll, G., Freitag, P., Hirschburger, M., Kaufmann, A., Garn, H., Padberg, W., Grau, V. (2007) Macrophages in experimental rat lung isografts and allografts: infiltration and proliferation in situ. *J. Leukoc. Biol.* 81(1), 186-194.
- 117 Schütt, C., Bröker, B. (2011) *Grundwissen Immunologie*, 3. Auflage Spektrum Akademischer Verlag
- 118 Sekine, Y., Bowen, L. K., Heidler, K. M., Van Rooijen, N., Cummings, O. W., Wilkes, D. S. (1997) Role of passenger leukocytes in allograft rejection: effect of depletion of donor alveolar macrophages on the local production of TNF- α , T helper 1/T helper 2 cytokines, IgG subclasses, and pathology in a rat model of lung transplantation. *J. Immunol.* 159, 4084–4093.
- 119 Sekine, Y., Yasufuku, K., Heidler, K. M., Cummings, O. W., Van Rooijen, N., Fujisawa, T., Brown, J., Wilkes, D. S. (2000) Monocyte chemoattractant protein-1 and RANTES are chemotactic for graft infiltrating lymphocytes during acute lung allograft rejection. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23, 719–726.
- 120 Shahbazian H. (2005) Short-term and long-term outcomes of kidney transplantation in diabetic and nondiabetic patients. *Urol. J.* 2(4), 197-200.
- 121 Shreeniwas, R., Schulman, L. L., Berkman, Y. M., McGregor, C. C., Austin, J. H. M. (1996) Opportunistic bronchopulmonary infections after lung transplantation: clinical and radiographic findings. *Radiology*. 200, 349–356.
- 122 Silva, V. F., Pazetti, R., Soto Sde, F., Siqueira, M. M., Correia, A. T., Jatene, F. B., Pego-Fernandes, P. M. (2011) Effects of mycophenolate sodium on mucociliary clearance using a bronchial section and anastomosis rodent model. *Clinics (Sao Paulo)*. 66(8), 1451-1456.
- 123 Sleiman, C., Mal, H., Fournier, M., Duchatelle, J. P., Icard, P., Groussard, O., Jebrak, G., Mollo, J. L., Raffy, O., Roue, C. et al. (1995) Pulmonary reimplantation response in single-lung transplantation. *Eur. Respir. J.* 8(1), 5-9.
- 124 Song, E., Ouyang, N., Horbelt, M., Antus, B., Wang, M., Exton, M., S. (2000) Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell. Immunol.* 204, 19-28.

- 125 Steinmüller, C., Steinhoff, G., Bauer, D., You, X. M., Denzin, H., Franke-Ullmann, G., Hausen, B., Bruggemann, C., Wagner, T. O., Lohmann-Matthes, M. L., Emmendorffer, A. (1997) Analysis of leukocyte activation during acute rejection of pulmonary allografts in noninfected and cytomegalovirus-infected rats. *J. Leukoc. Biol.* 61, 40–49.
- 126 Tamm, M., Aboyoun, C. L., Chhajed, P. N., Rainer, S., Malouf, M. A., Glanville, A. R. (2004) Treated cytomegalovirus pneumonia is not associated with bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J. Respir. Crit. Care. Med.* 170, 1120–1123.
- 127 Tarling, J. D., Lin, H. S., Hsu, S. (1987) Self-renewal of pulmonary alveolar macrophages: evidence from radiation chimera studies. *J. Leukoc. Biol.* 42, 443–446.
- 128 Thomas, E. D., Ramberg, R. E., Sale, G. E., Sparkes, R. S., Golde, D. W. (1976) Direct evidence for a bone marrow origin of the alveolar macrophage in man. *Science*. 192, no. 4243, 1016–1018.
- 129 Trulock, E. P., Christie, J. D., Edwards, L. B., Boucek, M. M., Aurora, P., Taylor, D. O., Dobbels, F., Rahmel, A. O., Keck, B. M., Hertz, M. I. (2007) Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplant report—2007. *J. Heart Lung Transplant.* 26(8), 782–795.
- 130 Trulock, E. P., Edwards, L. B., Taylor, D. O., Boucek, M. M., Keck, B. M., Hertz, M. I. (2005) Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-second official adult lung and heart–lung transplant report—2005. *J. Heart. Lung. Transplant.* 24, 945–982.
- 131 Utsumi, T., Mitzuta, T., Fujii, Y., Shiono, H., Okumura, M., Minami, M., Takeda, S., Miyoshi, S., Matsuda, H. (1999) Nitric oxide production by bronchoalveolar cells during allograft rejection in the rat. *Transplantation* 67, 1622–1626.
- 132 Valentine, V. G., Robbins, R. C., Berry, G. J., et al. (1996) Actuarial survival of heart–lung and bilateral sequential lung transplant recipients with obliterative bronchiolitis. *J. Heart. Lung. Transplant.* 15, 371–383.
- 133 Van den Berg, T. K., Döpp, E. A., Dijkstra, C. D. (2001) Rat macrophages: membrane glycoproteins in differentiation and function. *Immunol. Rev.* 184, 45–57.
- 134 Van den Berg, T., K., Puklavec, M., J., Barclay, A., N., Dijkstra, C., D. (2001) Monoclonal antibodies against rat leukocyte surface antigens. *Immunol. Rev.* 184, 109–116.
- 135 Van Muylem, A., Melot, C., Antoine, M., Knoop, C., Estenne, M. (1997) Role of pulmonary function in the detection of allograft dysfunction after heart-lung transplantation. *Thorax.* 52, 643–647.
- 136 Van oud Alblas, A. B., van Furth, R. (1979) Origin, Kinetics, and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J. Exp. Med.* 149(6), 1504–1518.
- 137 Verleden, G. M., Dupont, L. J., Van Raemdonck, D. E. (2005) Is it bronchiolitis obliterans syndrome or is it chronic rejection: a reappraisal? *Eur. Respir. J.* 25, 221–224.

- ¹³⁸ Verleden, G., Dupont, L. (2006) Obliterative bronchiolitis. In: Lynch, J. P., III, Ross, D. J., editors, Lung and heart-lung transplantation. New York: Taylor & Francis. 723–751.
- ¹³⁹ Vilchez, R. A., Dauber, J., McCurry, K., Iacono, A., Kusne, S. (2003) Parainfluenza virus infection in adult lung transplant recipients: an emergent clinical syndrome with implications on allograft function. *Am. J. Transplant.* 3, 116–120.
- ¹⁴⁰ Vos, R., Vanaudenaerde, B. M., Geudens, N., Dupont, L. J., Van Raemdonck, D. E., Verleden, G. M. (2008) Pseudomonal airway colonisation: risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation? *Eur. Respir. J.* 31, 1037–1045.
- ¹⁴¹ Weill, D., Dey, G. C., Hicks, R. A., et al. (2002) A positive donor gram stain does not predict outcome following lung transplantation. *J. Heart Lung. Transplant.* 21, 555–558.
- ¹⁴² Wiebe, B. M., Mortensen, S. A., Petterson, G., Svendsen, U. G., Andersen, C. B. (2001) Macrophage and lymphocyte chimerism in bronchoalveolar lavage cells from human lung allograft recipients. *APMIS.* 109(6), 435–440.
- ¹⁴³ Wilkes, D. S., Egan, T. M., Reynolds, H. Y. (2005) Lung transplantation-opportunities for research and clinical advancement. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 172, 944–955.
- ¹⁴⁴ Wilkes, D. S., Thompson, L. K., Cummings, O. W., Bragg, S., Heidler, K. M. (1998) Instillation of allogeneic lung macrophages and dendritic cells cause differential effects on local IFN- γ production, lymphocytic bronchitis, and vasculitis in recipient murine lungs. *J. Leukoc. Biol.* 64, 578–586.
- ¹⁴⁵ Yagyu, K., Steinhoff, G., Schafers, H. J., Dammenhayn, L., Haverich, A., Borst, H. G. (1990) Comparison of mononuclear cell subpopulations in bronchoalveolar lavage fluid in acute rejection after lung transplantation and Mycoplasma infection in rats. *J. Heart Transplant.* 9, 516–524.
- ¹⁴⁶ Yousem, S. A., Berry, G. J., Cagle, P. T., et al. (1996) Revision of the 1990 working formulation for the classification of pulmonary allograft rejection: Lung Rejection Study Group. *J. Heart. Lung. Transplant.* 15, 1–15.
- ¹⁴⁷ Zamora, M. R. (2004) Cytomegalovirus and lung transplantation. *Am J Transplant.* 4, 1219–1226.
- ¹⁴⁸ Zhao, M., Fernandez, L. G., Doctor, A., Sharma, A. K., Zarbock, A., Tribble, C. G., Kron, I. L., Laubach, V. E. (2006) Alveolar macrophage activation is a key initiation signal for acute lung ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 291(5), 1018–1026.

8 Publikationen

Originalarbeiten

Schmidt, A., Sucke, J., Fuchs-Moll, G., Freitag, P., Hirschburger, M., Kaufmann, A., Garn, H., Padberg, W., Grau, V. (2007) Macrophages in experimental lung isografts and allografts: infiltration and proliferation in situ. *J. Leukocyte. Biol.* **81**; 186-194.

Blöcher, S., Wilker, S., Sucke, J., Pfeil, U., Dietrich, H., Weimer, R., Steger, K., Kaufmann, A., Hirschburger, M., Plötz, C., Padberg, W., Grau, V. (2007) Acute rejection of experimental lung allografts: Characterization of intravascular mononuclear leukocytes. *Clin. Immunol.* **124**; 98-108.

Hackethal, A., Sucke, J., Oehmeke, F., Münstedt, K., Padberg, W., Tinneberg H. R. (2010) Establishing transvaginal NOTES for gynecological and surgical indications: benefits, limits and patient experience. *Endoscopy.* **42(10)**, 875-878.

Scheffler, M., Menges, T., Zörb, C., Sucke, J., Hempelmann, G. (2008) Successful thrombolysis of a massive pulmonary embolism following pneumonectomy. *Anaesthesist.* **57(4)**, 355-358.

Hartmann, B., Sucke, J., Brammen, D., Jost, A., Eicher, A., Röhrig, R., Junger, A. (2005) Impact of inadequate surgical antibiotic prophylaxis on perioperative outcome and length of stay on ICU in general and trauma surgery. Analysis using automated data collection. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **25(3)**, 231-236.

Publizierte Abstracts von Konferenzbeiträgen

Sucke, J., Fuchs-Moll, G., Freitag, P., Padberg, W., Grau, V. (2005) Proliferation of alveolar macrophages after lung transplantation in the rat. *Langenbecks. Arch. Surg.* **390**; 487-488.

Sucke, J., Fuchs-Moll, G., Freitag, P., Padberg, W., Grau, V. (2005) Proliferation of alveolar macrophages after lung transplantation in the rat. *Immunobiology* **210**; 391.

Nicht publizierte Abstracts von Konferenzbeiträgen

Sucke, J., Fuchs-Moll, G., Freitag, P., Padberg, W., Grau, V. (2005) Proliferation von Alveolarmakrophagen nach Lungentransplantation in der Ratte. 122. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie. 05.-08.04.2005, München

Sucke, J., Fuchs-Moll, G., Freitag, P., Padberg, W., Grau, V. (2005) Proliferation von Alveolarmakrophagen nach Lungentransplantation in der Ratte. 19th Meeting of the European Macrophage and Dendritic Cell Society (EMDS); 06.-08.10.2005, Amsterdam, Niederlande

9 Eidesstattliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

23. Dezember 2011

Jochen M. Sucke

10 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an meine Doktormutter Frau Prof. Dr. rer. nat. Veronika Grau, die mir nicht nur dieses interessante Thema zur Verfügung gestellt hat, sondern mich auch mit sehr viel Einsatz und Geduld in allen Phasen dieser Arbeit unterstützt hat.

Darüber hinaus bedanke ich mich bei dem gesamten Team der Sektion Experimentelle Chirurgie, namentlich bei Herrn PD Dr. med. Markus Hirschburger, der einen Teil der von mir bearbeiteten Transplantationen durchgeführt hat, sowie Frau Gabriele Fuchs-Moll, Frau Renate Pläß und Frau Petra Freitag, die mir bei der Durchführung der immunhistochemischen Färbungen mit Rat und Tat zur Seite standen. Nicht unerwähnt lassen möchte ich Frau Sandra Iffländer, die sich um die Versorgung der Tiere gekümmert hat und Frau Dr. rer. nat. Srebrena Atanasova-Koch, die mich bei der statistischen Auswertung unterstützt hat.

Mein Dank gilt ebenso Fr. Prof. Barbara Hoebee für die freundliche Überlassung der Sonde zum Nachweis des Y-Chromosoms.

Ich danke auch meinem ehemaligen Chefarzt und chirurgischen Lehrer Herrn Prof. Dr. med. Winfried Padberg für die gute klinische Ausbildung und die Möglichkeit, den experimentellen Teil der Arbeit während meiner Zeit als Oberarzt in seiner Klinik durchführen zu können.

Schließlich danke ich meiner Familie, meinen Eltern, die mir durch eine liebevolle, fordernde und fördernde Erziehung die Grundlagen für meinen Lebensweg bereitet haben. Vor allem aber danke ich meiner lieben Frau Nicola und meinen Kindern Lisa-Marie und Vincent Linus, die mich in höchstem Maße unterstützt haben und für mich zu jeder Zeit Rückhalt und Quell der Freude bedeuten.

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the
electronic version of the paper.**



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5932-3



9 783835 195932 3